

***Synergistische, TLR- und NLR-vermittelte IL-1 β -Sekretion
in Gliazellen sowie in Östrogen-inkubierten
Peritonealmakrophagen***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Linn Lundvall

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter: 1. Prof. Dr. Erwin Schneider

2. Prof. Dr. Ralf R. Schumann

3. Prof. Dr. Bastian Opitz

Tag der Disputation: 03. August 2015

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>II</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>X</i>
<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)	2
1.1.2 Nod-like Rezeptoren (NLRs).....	5
1.1.3 Mechanismus zur IL-1 β -Ausschüttung – Das Inflammasom	8
1.1.4 Alternative Mechanismen zur IL-1 β -Regulation.....	11
1.2 Zellen des Gehirns mit Immunfunktion	12
1.2.1 Mikroglia	12
1.2.2 Astrozyten.....	13
1.3 Die bakterielle Meningitis.....	14
1.3.1 Meningokokken-Meningitis	16
1.3.2 Meningitis durch <i>S. pneumoniae</i>	19
1.4 Der Einfluss von Östrogen auf das angeborene Immunsystem.....	21
1.5 Arbeitshypothesen.....	23
<i>2 Material und Methoden</i>	<i>25</i>
2.1 Humaner und muriner IL-1 β -ELISA	25
2.2 Muriner IL-6-ELISA	26
2.3 Infektion von Mäusen mit dem Meningitis-Erreger <i>S. pneumoniae</i>	26
2.3.1 Proteinextraktion aus Organen	27
2.4 Astrozyten- und Mikrogliapräparation aus der neonatalen WT-, NOD2 ^{-/-} -und TLR2/4 ^{-/-} -Maus	27
2.4.1 Abschütteln von Mikrogliazellen und Erstellen einer Monokultur	28
2.4.2 Stimulation der Mikroglia- und Astrozytenzellen	29
2.4.3 Nachweis von Mikroglia- und Astrozytenzellen mittels Immunfluoreszenz ..	29
2.5 Stimations-Assay von Zelllinien	30
2.6 Kultivierung von Zelllinien.....	31
RAW 264.7 (Murine Peritonealmakrophagen Zelllinie).....	31

THP1 (humane monozytäre Zelllinie).....	32
U-87MG (humane Astrozytoma-Zelllinie).....	32
BV-2 (murine Mikroglia-Zelllinie)	32
2.7 Präparation von primären Peritonealmakrophagen aus WT-und NOD2 ^{-/-} -Mäusen	33
2.8 Zelllyse und SDS-PAGE.....	34
2.9 Western Blot.....	35
2.10 Inkubation der murinen Peritonealmakrophagen-Zelllinie RAW264.7 mit 17β-Östradiol	37
2.10.1 RNA Interferenz mittels Elektroporation	37
2.10.2 TLR4- und NOD2-Stimulation der siRNA-transfizierten RAW264.7 Zellen mit bakteriellen Liganden.....	38
2.10.3 RNA-Extraktion aus siRNA-transfizierten RAW264.7 Zellen	39
2.10.4 Reverse-Transkription (RT)	39
2.10.5 Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA.....	40
2.10.6 Caspase-1 Aktivitäts-Assay	41
2.11 Statistische Analyse.....	42
2.12 Material	43
2.12.1 Zellen, Zellkulturmedien und Kulturmediumzusätze	43
2.12.2 Kits, bakterielle Liganden und Antikörper	44
2.12.3 siRNA-Ribonukleotide, Primer für PCR mit cDNA und Standards	45
2.12.4 Anästhetika, Präparationsbesteck und –bedarf und Puffer.....	46
2.12.5 Anästhetika	46
2.12.6 Chemikalien, Verbrauchsgegenstände, Laborgeräte, Software.....	48
3 <i>Ergebnisse</i>	52
3.1 Erhöhte IL-1β-Freisetzung im Maus-Gehirn nach Pneumokokken-Infektion	52
3.2 Stimulation von Zelllinien mit Zellwandbestandteilen Gram-negativer Bakterien	54
3.3 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR-und NLR-Synergie durch Stimulation mit LPS und MDP	57
3.3.1 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR-und NLR-Synergie durch Stimulation mit Pam ₂ Cys und MDP	60
3.3.2 Primäre murine Astrozyten zeigen keine synergistische IL-6-Produktion nach Stimulation mit LPS bzw. Pam ₂ Cys und MDP	61
3.3.3 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR-und NLR-Synergie bei gleichzeitiger Caspase-1-Aktivität.....	63

3.4	Die Astrozyten-ähnliche humane U-87MG-Zelllinie zeigt TLR-und NLR-Synergie durch Stimulation mit LPS bzw. Pam ₂ Cys und MDP.....	67
3.4.1	Die humane U-87MG-Zelllinie zeigt TLR-und NLR-Synergie bei gleichzeitiger Caspase-1-Aktivität.....	69
3.5	Primäre murine Mikroglia zeigen keine Synergie in der IL-1 β -Ausschüttung nach Stimulation mit LPS und MDP, jedoch nach LPS-und ATP-Stimulation	70
3.5.1	Primäre murine Mikroglia und die zytosolische Aktivierung von Caspase-1	72
3.6	Primäre murine Peritonealmakrophagen zeigen TLR-und NLR-Synergie.....	74
3.6.1	Die TLR-und NLR-Synergie ist Östrogen-abhängig in primären Peritonealmakrophagen von weiblichen Nod2 ^{-/-} -Mäusen	74
3.6.2	Primäre Peritonealmakrophagen der männlichen WT ^{-/-} -Maus, jedoch nicht der NOD2 ^{-/-} -Maus, zeigen TLR-und NLR-Synergie.....	80
3.6.3	IL-1 β -Ausschüttung in RAW 264.7-Zellen nach Ko-Stimulation von TLR4 und NOD2 unter Östrogen-Einfluss.....	85
3.7	Caspase-1 Aktivitätsassay	88
4	<i>Diskussion</i>	91
4.1	Die Rolle der Astrozyten und Mikroglia bei der IL-1 β -Reifung während einer Infektion	91
4.1.1	Astrozyten.....	91
4.1.2	Mikroglia	94
4.2	Östrogen-Einfluss auf murine Peritonealmakrophagen während einer Infektion	95
4.3	Mögliche Mechanismen zur IL-1 β -Regulierung.....	98
4.4	Vergleich der Caspase-1-Aktivierung zwischen WT-Astrozyten und WT-Peritonealmakrophagen	100
4.5	Methodenkritik dieser Arbeit	100
5	<i>Ausblick</i>	102
	<i>Literaturverzeichnis</i>	104
	<i>Publikationsliste</i>	129
	<i>Danksagung</i>	130
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	131

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: TLR-vermittelte Immunantwort.....</i>	<i>3</i>
<i>Abb. 2: Muriner TLR1-TLR6-Heterodimerisationskomplex mit Ligand Pam₂CSK₄ (A) und TLR4-Heterodimerisationskomplex mit MD-2 und Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli O111:B4 (B).</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 3: Die NLR-Rezeptoren NOD1 und NOD2.</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 4: Schema des zytosolischen Inflammasom-Komplexes am Beispiel von NLRP3 und NLRP1.</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 5: Multiple IL-1β-schneidende Enzyme.</i>	<i>12</i>
<i>Abb. 6: Hirn- und Rückenmarkshäute</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 7: Zellwand eines Gram-negativen Bakteriums.</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 8: Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums.</i>	<i>19</i>
<i>Abb. 9: Schema des Signalwegs zur IL-1β-Reifung.....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 10: Immunfluoreszenz von Mikroglia und Astrozyten.....</i>	<i>30</i>
<i>Abb. 11: Hirnhomogenat der Maus mit und ohne 24h Pneumokokken-Infektion.</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 12: IL-1β-Konzentrationen von RAW264.7 Zellen</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 13: Western Blot von RAW264.7-Zellen.</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 14: IL-1β-Konzentrationen nach Stimulation der humanen THP1-Zelllinie</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 15: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und MDP-Stimulation.....</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 16: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und ATP-Stimulation.....</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 17: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Astrozyten nach Pam₂Cys-und MDP-Stimulation.....</i>	<i>61</i>
<i>Abb. 18: Muriner IL-6-ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und MDP-Stimulation.....</i>	<i>62</i>
<i>Abb. 19: Muriner IL-6-ELISA von primären murinen Astrozyten nach Pam₂Cys-und MDP-Stimulation.....</i>	<i>63</i>
<i>Abb. 20: Western Blot von IL-1β aus primärem murinen WT-Astrozyten-Lysat.....</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 21: Western Blot von Caspase-1 aus primärem murinen WT-Astrozyten-Lysat.....</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 22: Western Blot von Caspase-1 und IL-1β aus primärem murinen Nod2^{-/-}-Astrozyten-Lysat.</i>	<i>66</i>
<i>Abb. 23: Humaner IL-1β-ELISA von U-87-Zellen nach LPS-und MDP-Stimulation.</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 24: Humaner IL-1β-ELISA von U-87- Zellen nach Pam₂Cys-und MDP-Stimulation.</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 25: Western Blot von Caspase-1 und IL-1β aus humanem U-87MG-Lysat.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 26: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Mikroglia nach LPS-und MDP-Stimulation.....</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 27: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Mikroglia nach LPS-und ATP-Stimulation.....</i>	<i>72</i>

<i>Abb. 28: Western Blot von Caspase-1 und IL-1β aus primärem murinen WT-Mikroglia-Lysat.</i>	73
<i>Abb. 29: Muriner IL-1β-ELISA von weiblichen primären murinen Peritonealmakrophagen nach LPS-und MDP-bzw. ATP-Stimulation</i>	75
<i>Abb. 30: Western Blot von Caspase-1, IL-1β, ASC und β-Actin aus Peritonealmakrophagen-Lysat der weiblichen WT-Maus.</i>	77
<i>Abb. 31: Western Blot von Caspase-1, IL-1β, ASC und β-Actin aus Peritonealmakrophagen-Lysat aus der weiblichen NOD2^{-/-}-Maus.</i>	79
<i>Abb. 32: Muriner IL-1β-ELISA von männlichen primären murinen Peritonealmakrophagen nach LPS-und MDP-bzw. ATP-Stimulation</i>	81
<i>Abb. 33: WB von Caspase-1, IL-1β und ASC aus Peritonealmakrophagen-Lysat der männlichen WT-Maus.</i>	83
<i>Abb. 34: WB von Caspase-1, IL-1β und ASC aus Peritonealmakrophagen-Lysat der männlichen NOD2^{-/-}-Maus.</i>	84
<i>Abb. 35: Nod2-knock-down (24h) in RAW264.7-Zellen ohne E2.</i>	86
<i>Abb. 36: Nod2-knock-down (24h) in RAW264.7-Zellen, vorinkubiert mit 1 nM E2</i>	87
<i>Abb. 37: Caspase-1-Assay von RAW264.7-Zellen mit Nod2-knock-down ohne E2.</i>	88
<i>Abb. 38: Caspase-1-Assay von RAW264.7-Zellen mit Nod2-knock-down, vorinkubiert mit 1nM E2.</i>	89

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Liganden für InVitro Stimulation</i>	31
<i>Tab. 2: Übersicht über die primären murinen Peritonealmakrophagen</i>	33
<i>Tab. 3: Pipettierschema für das Gießen von SDS-PAGE Gelen</i>	34
<i>Tab. 4: Primär- und Sekundär-Antikörper im Western Blot</i>	36
<i>Tab. 5: Stripping-Puffer für Western Blot</i>	37
<i>Tab. 6: Schema der Transfektionsansätze für siRNA</i>	38
<i>Tab. 7: Master-Mix Protokoll für RT-PCR</i>	40
<i>Tab. 8: Pipettierschema für PCR</i>	41
<i>Tab. 9: Versuchsschema zur Infektion von Mäusen mit S. pneumoniae, Stamm D39</i>	53

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain
ATP	Adenosin-triphosphat
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
Casp-1	Caspase-1 (Cysteinyl-Aspartat spezifische Protease)
cfu	Kolonie-formende Einheiten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAMP	Danger-associated molecular pattern (Gefahren-assoziiertes molekulares Muster)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
E2	17β-Östradiol
FCS	Fötales Kälberserum
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
iE-DAP	γ-D-Glutaminsäure-meso-Diaminopimelinsäure
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor-κB-Kinase
IL	Interleukin
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
kDa	Kilo Dalton
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeats (Leucin-reiche Wiederholungen)
LTA	Lipoteichonsäuren
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAVS	Mitochondrielles antiviral-signalisierendes Protein
MDP	Muramyldipeptid
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E and TP1 (s. NBD, NOD)
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NF-κB	Nukleärer Faktor 'kappa-leichte-Kette-Verstärker' von aktivierten B-Zellen
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP	NACHT-, LRR-and PYD domain enthaltendes Protein
NOD	Nukleotid-Oligomerisierungsdomäne
oxATP	oxidiertes ATP
Pam ₂ CSK ₄	Synthetisches, diazyliertes Lipopeptid

Pam ₃ CSK ₄	Synthetisches, triazyliertes Lipopeptid
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS-T	Phosphat-buffered saline with Tween20 (Phosphat-gepufferte Saline mit Tween20)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pNA	p-Nitroanilin
PRR	Pattern recognition receptor (Mustere kennender Rezeptor)
PYD	Pyrin Domäne
RIP2	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2
rh	Rekombinant human (rekombinant hergestelltes Protein)
rm	Rekombinant murin (rekombinant hergestelltes Protein)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	short interfering RNA (kurze, interferierende RNA)
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
Th	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
ÜN	Über Nacht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YVAD-CHO	Tyrosin-Valin-Alanin-Aspartat-Aldehyd
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die synergistische Beziehung zwischen TLRs und NLRs des angeborenen Immunsystems in Bezug auf die Zytokinsekretion durch IL-1 β in murinen und humanen Astrozyten und Mikroglia untersucht. IL-1 β ist ein streng reguliertes Zytokin, das durch zwei Signalwege reguliert wird. Durch eine erste Stimulation wird der TLR-Rezeptor getriggert und eine NF- κ B-abhängige Signaltransduktion führt zur Expression der Vorläuferform des Proteins, proIL-1 β (269 Aminosäuren, AS). In einem weiteren Schritt, durch einen zweiten Stimulus, wird ein zytoplasmatischer NLR-Rezeptor zur Caspase-1-Aktivierung angeregt. Dies führt zur post-translationalen Prozessierung von proIL-1 β zu reifem IL-1 β , mit einer Länge von 153 AS. Die verwendeten bakteriellen Bestandteile LPS, Pam₂CSK₄ und MDP in den Stimulationsversuchen sollten das Eindringen von Pathogenen ins zentrale Nervensystem (ZNS), wie sie bei einer bakteriellen Meningitis vorkommen können, simulieren. Dabei kamen die humane Astrozytenzelllinie U-87MG und Mikrogliazelllinie BV-2 sowie primäre murine Zellen aus WT-, NOD2^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-C56/Bl6-Mäusen zum Einsatz. Mittels ELISA und Western Blot wurden die an der IL-1 β -Regulation beteiligten Proteine untersucht. Zum ersten Mal wurde durch die vorliegende Arbeit gezeigt, dass die TLR-abhängige IL-1 β -Antwort durch NOD2-Beteiligung in murinen und humanen Astrozyten synergistisch erhöht wird. Diese Synergie in der IL-1 β -Produktion zwischen NOD2 und TLR2 bzw. TLR4 wird auf post-translationaler Ebene in einer Caspase-1-abhängigen Weise vermittelt, wie Western-Blot-Versuche zeigen. Deshalb trägt NOD2 als MDP-getriggelter Rezeptor in Astrozyten, vermutlich zusammen mit dem Inflammasom-Komplex, tatsächlich zur Caspase-1-Aktivierung bei. Die aktivierte Caspase-1 war bei NOD2^{-/-}-Mäusen nicht mehr zu detektieren. Die Stimulation durch LPS und ATP führte zu einer Caspase-1-unabhängigen, erhöhten IL-1 β -Sekretion in murinen Astrozyten jedoch ohne Beteiligung des NOD2-Rezeptors. Die exogene Zugabe von ATP führt demnach zu einer NOD2- und Caspase-1-unabhängigen IL-1 β -Reifung, wie aus murinen NOD2^{-/-}-Astrozyten hervorgeht. In humanen sowie murinen Mikrogliazellen lässt sich der bei Astrozyten gezeigte Effekt nicht reproduzieren. In den Mikrogliaversuchen dieser Arbeit lässt sich kein synergistischer IL-1 β -Anstieg im Überstand durch TLR/NLR-Stimulation feststellen. Die zytoplasmatisch exprimierten Proteine proIL-1 β und proCaspase-1 konnten nachgewiesen werden, jedoch nicht

aktivierte Caspase-1. Dennoch zeigte die Stimulation mit LPS und ATP einen synergistischen Effekt in der IL-1 β -Akkumulation, wie aus ELISA- und Western-Blot-Versuchen hervorgeht.

In einem weiteren Versuchsteil wurde in primären murinen WT- und NOD2^{-/-}-Peritonealmakrophagen von adulten C56/Bl6-Mäusen der TLR/NLR-Synergismus untersucht, um einen Zelltyp des mononukleären-phagozytären-Systems, aus dem auch Mikroglia entstammen, zu testen. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass weibliche NOD2^{-/-}-Mäuse zu einer synergistisch erhöhten IL-1 β -Sekretion fähig waren, im Gegenteil zu männlichen NOD2^{-/-}-Mäusen, die keine signifikant erhöhten IL-1 β -Werte aufwiesen. SiRNA-Versuche mit in Östrogen vorinkubierten RAW264.7-NOD2^{-/-}-Zellen zeigten eine eindeutige Synergie der TLR4- und NOD2-Rezeptoren in der IL-1 β -Ausschüttung. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein NOD2-unabhängiger Mechanismus eingreift, um proIL-1 β zur Reifung zu bringen. Östrogen scheint weiblichen Organismen einen protektiven Vorteil vor Infektionen bei NOD2-Defizienz zu verschaffen.

1 Einleitung

Vertebraten sind einem ständigen Angriff und einer Invasion von Mikroorganismen ausgesetzt und haben deshalb Verteidigungssysteme entwickelt, um infektiöse Pathogene aus dem Körper zu eliminieren. Säugetiere besitzen zwei Systeme zur Infektionsabwehr: das angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem [1].

Das erworbene Immunsystem ist in der späten Phase der Entzündung an der Eliminierung der Pathogene beteiligt sowie an der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Es ist charakterisiert durch Spezifität und entwickelt sich durch klonale Selektion von Lymphozyten, die ein riesiges Repertoire an Antigen-spezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Diese werden durch einen Mechanismus entwickelt, der als „Gen-rearrangement“ bekannt ist [2], [3]. Das angeborene Immunsystem ist der sofort eingreifende Verteidigungsmechanismus gegen eindringende Pathogene und wird durch verschiedene Zelltypen charakterisiert, die als „Antigen-präsentierende Zellen“ zusammengefasst werden können (APC). Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Es kann zwischen „selbst“, den eigenen Zellen und Molekülen des Organismus, und „nicht-selbst“, d.h. einer Vielzahl eindringender Pathogene unterscheiden [4]. Pathogene werden von sogenannten „Pattern recognition receptors“ (PRRs), also Muster-erkennenden Rezeptoren erkannt, die auf den Oberflächen der APCs sitzen und spezifisch nur fremdartige Strukturen, von z.B. Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten erkennen. Sie sind Keimbahn-kodiert, nicht-klonal, evolutiv hoch-konserviert und werden konstitutiv exprimiert [5].

1.1 Das angeborene Immunsystem

Durch Kooperation des angeborenen und adaptiven Immunsystems können Pathogene mit höchster Effizienz eliminiert werden. Das angeborene Immunsystem ist ein evolutiv/evolutionär konserviertes System, das die erste Barriere gegen eindringende Pathogene darstellt [1]. Die dabei involvierten Zelltypen sind Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, neutrophile/basophile/eosinophile Granulozyten), Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK) [6]. Diese Zellen detektieren die mikrobielle Infektion, phagozytieren das Pathogen und präsentieren pathogene Antigene auf ihrer Oberfläche und lösen somit eine Immunantwort aus. Im Gegensatz dazu, ist das erworbene Immunsystem

hoch-spezifisch und lange fortbestehend, wobei sich ein immunologisches Gedächtnis herausbildet aber es wird erst in einer späten Phase der Infektion involviert. Das angeborene Immunsystem detektiert mikrobielle Infektionen mit Hilfe von PRRs [7], die das molekulare Muster der Pathogene erkennen können. Diese molekularen Muster werden als PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) bezeichnet. PAMPs sind in Pathogenen weit verbreitet jedoch nicht in der Wirtszelle, daher können PRRs zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ unterscheiden. Einige Rezeptoren können verschiedene endogene Moleküle detektieren, die bei Gewebs- oder Zellschädigung der Wirtszelle entstehen. Diese Moleküle werden als DAMPs („danger-associated molecular patterns“) bezeichnet, dazu gehören z.B. Harnsäurekristalle [8], Amyloid- β -Plaques [9] und ATP [10], [11].

1.1.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Das Toll-Gen wurde erstmals von Christiane Nüsslein-Volhard als eines von fünfzehn Genen im Organismus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben, das während der Embryogenese eine wichtige Rolle für den Körperbau und die Ausformung der Körpersegmente der Fliege spielt [12], [13]. Neu war, dass ähnliche und sogar identische Gene auch in höher entwickelten Organismen sowie im Menschen vorkommen. Außerdem fand die Arbeitsgruppe 1996 um Lemaitre heraus, dass bei Toll-mutierten *Drosophila*-Fliegen vermehrt starke Pilzinfektion auftraten [14]. Daraufhin wurde ein humanes Homolog zu Toll gefunden, das in der Lage war, eine angeborene Immunantwort durch die Expression inflammatorischer Zytokine zu induzieren [15].

TLRs wandern aus dem Endoplasmatischen Reticulum an die Zelloberfläche (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10) und ins Endolysosom (TLR3, auch TLR4, 7, 8, 9, 11, 12, 13) wo sie PAMPs und DAMPs verschiedener Struktur detektieren können. TLR11 kommt in der Maus und im Menschen vor, TLR12 und 13 kommen nur in der Maus vor [16].

TLRs an der Zelloberfläche sind hauptsächlich für die Erkennung von Strukturen bakteriellen Ursprungs und für Pilze verantwortlich [16]. Intrazelluläre TLRs sind für die Erkennung bakterieller und viraler Nukleinsäure zuständig. Es sind Typ I Transmembranproteine, die aus drei Domänen bestehen: LRRs (leucine-rich repeats) der Ectodomain, die die Erkennung des jeweiligen PAMP vermitteln, eine Transmembrandomäne und eine intrazel-

luläre Domäne TIR (Toll/IL-1R), die Homolog zur IL-1R Familie ist und für das Downstream-Signaling benötigt wird [17].

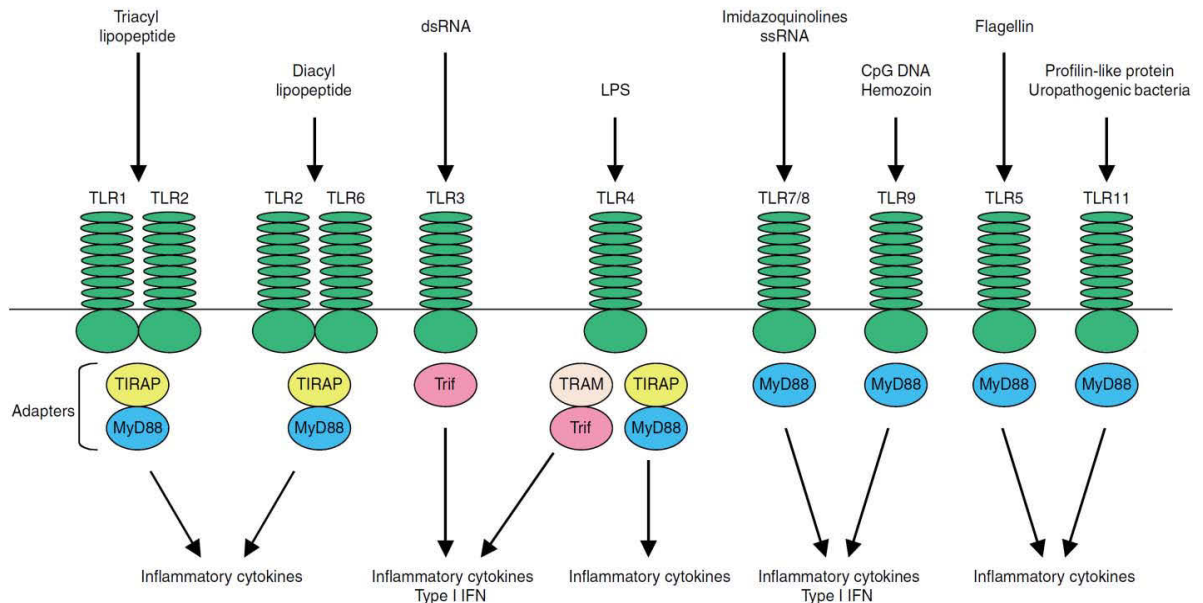


Abb. 1: TLR-vermittelte Immunantwort.

TLR2 in Verbindung mit TLR6 oder TLR1 unterscheidet in der Mustererkennung zwischen diacylierten und triacylierten Lipopeptiden. TLR3 erkennt dsRNA. TLR4 erkennt LPS. TLR7 und 8 vermitteln die Erkennung von Imidazol und ssRNA. TLR5 detektiert Flagellin. TLR11 erkennt Bestandteile von uropathogenen Bakterien (UPEC) und Profilin-ähnliche Moleküle der Parasiten *T. gondii* und *P. falciparum*, sowie Flagellin. TLR10 kann Influenza A Virus-Infektionen detektieren und kollaboriert mit TLR2, um Liganden von *Listeria* zu detektieren. Nicht abgebildet sind TLR12 und 13. TLR12 bildet mit TLR11 Heterodimere im Endosom und erkennt Profilin und TLR13 erkennt bakterielle 23S rRNA [18], [19]. Graphik nach [20].

Aus der Abbildung 1 wird ersichtlich, welche Liganden von den jeweiligen Toll-like Rezeptoren erkannt werden und welche Adapter die Signalkaskade durch TIR-TIR-Interaktion unterstützen (MyD88, TIRAP, Trif, TRAM). Alle TLRs bis auf TLR3 verwenden den MyD88-abhängigen Signalweg. TLR3 interagiert mit Trif zur Expression von Typ-I-Interferonen [21].

Die dreidimensionale Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TLR1, 2, 3 und 4 zeigt die Form einer Spule (loop). Bei TLR3 bildet die Anordnung der LRRs eine Einheit, bei TLR1, 2 und 4 ist sie in drei Bereiche unterteilt [22], [23]. TLR4 besitzt die Fähigkeit zur Homodimerisierung (TLR4 + TLR4). TLR2 heterodimerisiert mit TLR1, um zusammen triacylierte Lipopeptide zu erkennen. Wenn TLR2 mit TLR6 dimerisiert, kann diacyliertes Lipopeptid detektiert werden (Abb. 2A) [24], [25]. Lipopeptide kommen sowohl in

Gram-positiven Bakterien und Mykobakterien, wie auch in zellwandlosen Bakterien (*Mycoplasma*) und Borrelien vor. Diese Möglichkeit von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 zu heterodimerisieren wurde vermutlich entwickelt, um ein möglichst breites Spektrum an Lipopeptiden abzudecken, die es dem Immunsystem erlaubt möglichst viele Pathogene zu erkennen [26]. TLR2 aktiviert den „myeloid differentiation primary response gene 88“ (MyD88) – abhängigen Signalweg. TLR4 ist an der Erkennung des Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien beteiligt [27].

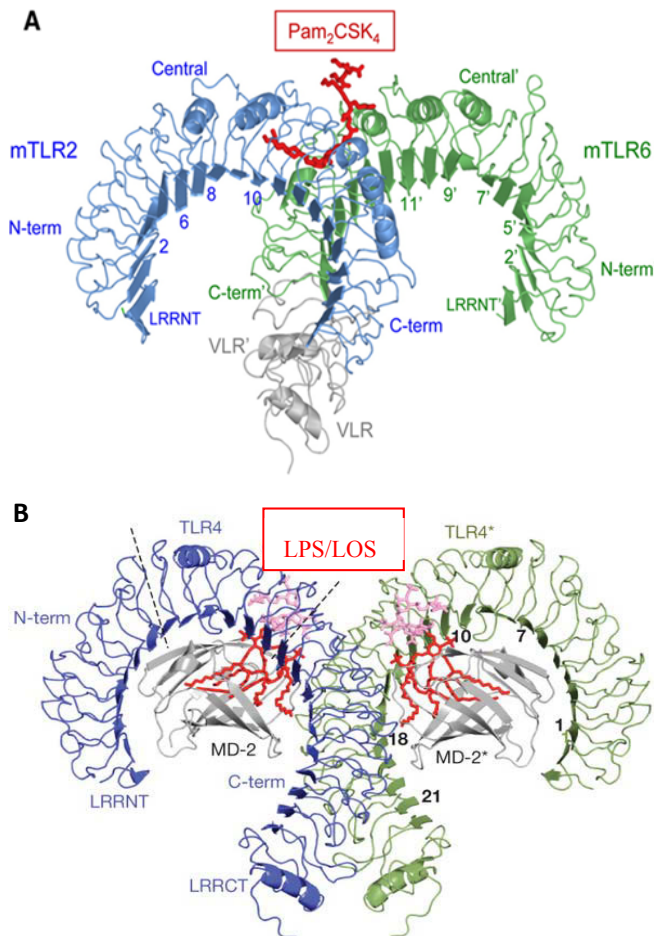


Abb. 2: Muriner TLR2-TLR6-Heterodimerisationskomplex mit Ligand Pam₂CSK₄ (A) und TLR4-Heterodimerisationskomplex mit MD-2 und Lipopolysaccharid (LPS) aus *E.coli* O111:B4 (B).

A) Das diazylierte Lipopeptid Pam₂CSK₄ wurde aus 1 Serin und 4 Lysin synthetisiert (rot). Angefügt ist eine Fettsäure. **B)** LPS besteht aus einem Lipid A-Teil (rot; zwei Glukosamin-Zucker und eine variable Zahl an Fettsäuren), einem Kernoligosaccharid, das aus einem inneren und äusseren Teil besteht (pink) und einem O-Antigen. Beim LOS der *Neisserien* fehlt das O-Antigen. LRRNT=LRR-Amino Terminal; LRRCT=LRR-Carboxy-Terminal (Graphiken nach [28] und [29]).

TLR4 formt einen Komplex zusammen mit MD-2, das als LPS-bindende Komponente im TLR4-MD-2 Komplex dient, da TLR4 und LPS scheinbar nicht direkt miteinander interagieren (s. Abb. 2B) [30]. Das LPS-bindende Protein (LBP) bindet LPS und CD14, ein Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) – gebundenes Protein und befördert das LBP-LPS zum TLR4-MD-2-Komplex [31], [32]. TLR4 aktiviert zwei Signalwege: den MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88)–abhängigen Signalweg und den TRIF (TIR-containing adapter inducing IFN β)–abhängigen Signalweg [33], [35]. Die Adaptermoleküle

MyD88 und TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) aktivieren daraufhin IRAK4 und IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinases), die zu den Serin/Threonin-Kinasen gehören, und TRAF6 (tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) [34], [36]. Das führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes (inhibitor of nuclear factor κ B (I κ B)-kinase), bestehend aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ (auch IKK1, IKK2 und NEMO). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch IKKs von seinem Inhibitor I κ B durch Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung und Degradation befreit und kann in den Nukleus translozieren, wo er die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine induzieren kann [37].

Der MyD88-unabhängige Signalweg involviert statt der Adapter MyD88 und TIRAP die Adaptorproteine TRAM (TRIF-related adaptor molecule -> über TLR4) und TRIF (über TLR3) und ist hauptsächlich an der anti-viralen Erkennung beteiligt. Diese Adapter aktivieren IKK- ϵ und TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase1) und diese wiederum aktivieren downstream den Transkriptionsfaktor IRF3 (interferon-regulatory factor 3) durch Phosphorylierung. Daraufhin dimerisiert IRF3 und wird in den Nukleus transloziert, wo es die Transkription von Typ I IFN-Genen (IFN- β) aktiviert [38], [39]. Gleichzeitig interagiert TRIF mit TRAF6 und vermittelt auch so eine MyD88-unabhängige NF- κ B-Aktivierung. Somit werden IFN- β und pro-inflammatorische Zytokine nach TLR4-Aktivierung exprimiert. TLR4 ist hierdurch an zahlreichen entzündlichen Prozessen und Infektionskrankheiten im menschlichen Körper beteiligt [40].

1.1.2 Nod-like Rezeptoren (NLRs)

Um Mikroorganismen zu detektieren, haben Pflanzen und Tiere neben den Toll-like Rezeptoren eine weitere Gen-Familie mit LRRs hervorgebracht, den NOD-like Rezeptoren (NLRs) [41], [42]. Diese zytoplasmatische NBD-LRR-Familie besitzt 3-30 Mal mehr Mitglieder als die membranständigen TLRs, vermutlich um ein breites Spektrum von Erregern erfassen zu können [43], [44].



Abb. 3: Die NLR-Rezeptoren NOD1 und NOD2.

Die Rezeptoren besitzen eine C-terminale Leucin-reiche Wiederholungsdomäne (LRRs), die an der Pathogen-Erkennung beteiligt ist. Mittig liegt eine Dimerisierungsregion (NBD) und N-terminal finden sich bei NOD2 zwei CARD-Domänen und bei NOD1 eine CARD-Domäne (caspase-recruitment domain).

Die allgemeine Struktur der NLRs besteht aus drei Domänen. Die C-terminale LRR-Region ist an der Ligandenerkennung beteiligt. Die zentrale NBD (Nukleotid-bindende Domäne, auch bekannt als NACHT-Domäne) fungiert als ATP-abhängige Dimerisations- bzw. Oligomerisationsdomäne. Die N-terminale Domäne enthält entweder eine Protein-Protein-Interaktionskassette (CARD, caspase-recruitment domain) [45], eine Pyrin-Domäne (PYD) [46] oder eine BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat)-Domäne [47]. NOD2 (nucleotide-oligomerization domain 2) besteht aus einer C-terminalen LRR-Region, einer zentralen NBD und zwei N-terminalen CARD-Domänen, die mit anderen Proteinen interagieren können (Abb. 3).

Es detektiert Muramyl-Dipeptid (MDP), welches die Minimalstruktur von Peptidoglykan ist, das in allen Zellwänden Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien vorkommt [48], [49], [50]. Es besteht aus alternierenden Glykanketten von *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die untereinander durch kurze Peptide (Crosslinker) verbunden sind. Somit wird ein stabiles Polymer aufgebaut, das die Bakterienzelle umgibt [51]. Ein Unterschied im Muramyldipeptid zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien besteht in der Aminosäuresequenz der kurzen Crosslinker-Peptide: bei Gram-Positiven ist die dritte Aminosäure Lysin, bei Gram-Negativen Diaminopimelinsäure (DAP) [52]. NOD2 detektiert also das Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP; $C_{19}H_{32}N_4O_{11} \times H_2O$), das in allen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorkommt.

Der NOD1-Rezeptor besteht aus einer C-terminalen LRR-Region, einer zentralen NBD und einer N-terminalen CARD-Domäne (Abb. 3). NOD1 ist darauf spezialisiert, das natürlicherweise in Gram-negativen Bakterien vorkommende Degradationsprodukt von Peptidoglykan zu erkennen: GlcNAc-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP (GM-TriDAP;

C₁₅H₂₆N₄O₈) [45]. NOD1 wurde als erstes 1999 entdeckt [53], und im Zuge dessen NOD2 [53], [54]. NOD1 und NOD2 detektieren intrazelluläre Bakterien, die phagozytiert wurden oder extrazelluläre Bakterien, die mit einem Sekretionssysteme Peptidoglykan-Strukturen injizieren können [55]. Einige Publikationen beschreiben den folgenden Signalweg für NOD1 und NOD2: Wenn NOD1 und NOD2 aktiviert werden, oligomerisieren sie und treten mit der Serin/Threonin-Kinase RIP2 durch ihre N-terminale CARD-Domäne in Kontakt. RIP2 wird ubiquitiniert und interagiert mit TAK1, was zur Aktivierung von NF-κB und MAP-Kinasen führt. Daraufhin wird NF-κB in den Nucleus transloziert und proinflammatorische Zytokine werden exprimiert [56], [57], [58]. NOD2 nimmt auch eine Rolle in der Viruserkennung ein. Es detektiert virale ssRNA und aktiviert IRF3 über den Adaptor MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), um INF-β zu exprimieren [59].

NLR-Proteine können auch unabhängig vom RIP2- und NF-κB-Signaling funktionieren. Das Inflammasom bildet mit mehreren Proteinen einen hochmolekularen Komplex, der Caspase-1 aktiviert [60]. Die Cystein-Protease Procaspace-1, ursprünglich ein 45 kDa schweres Zymogen, wird autokatalytisch zu den Untereinheiten p10 und p20 (Heterotetramer) prozessiert und ist damit aktiviert [61], [62]. Diese Protease entstammt der evolutiv konservierten Familie der inflammatorischen und apoptotischen Caspasen. Es assoziieren zwei Heterodimere zu einem Tetramer, um in die aktive Form zu treten [63]. Daraufhin wird proIL-1β (31 kDa) von Caspase-1 zur reifen Form IL-1β (17 kDa) post-translational geschnitten. Die Aufgabe des Inflammasoms ist die IL-1β Regulation, die ein wichtiger Schritt im Entzündungsprozess ist, da IL-1β ein Mediator bei vielen wichtigen Prozessen ist (Fieber, Entstehung von Tumoren etc.) und eine Dysregulation zu schwerer Schädigung des Gewebes und Tod führen kann [64]. Die Publikationen von Martinon *et al.* (2004) und Marina-Garcia *et al.* (2008) sehen den NLRP3-Rezeptor (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) und das Inflammasom, das aus dem NLRP3-Rezeptor, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain), Caspase-1 und Caspase-5 besteht, als alleinigen Caspase-1-Aktivator durch eine Stimulation mit MDP an [65], [66].

Pan *et al.* (2007) und Hedl & Abraham (2013) sehen einen Zusammenhang zwischen NOD2 und dem NLRP3-Inflammasom in murinen BMDM. Beide Rezeptoren werden durch MDP aktiviert und formen möglicherweise einen Komplex, um Caspase-1 zu akti-

vieren [67], [68]. Ein Priming der Zellen unter anderem mit LPS, einem TLR4-Agonisten, ist nötig, damit proIL-1 β durch NF- κ B-Aktivierung exprimiert werden kann. Eine weitere Publikation fand heraus, dass NOD2 nach MDP-Stimulation in Makrophagen mit ihrer N-terminalen CARD-Domäne direkt an die CARD-Domäne der Caspase-1 bindet und IL-1 β prozessiert und sezerniert. Dabei bildet es einen Komplex mit NLRP1 des NLRP1-Inflammasoms [69]. Die Arbeitsgruppe um Ferwerda *et al.* (2008) beobachtete NOD2 als alleinigen möglichen Caspase-1-Aktivator [70]. Mutierte Allele von *NOD2* wurden bisher mit einer verminderten Aktivierung von NF- κ B in Verbindung gebracht [71]. *In vitro*-Studien zu murinen Mikroglia und Astrozyten zeigen, dass NOD2 in diesen Zellen nach Kontakt mit *N. meningitidis* und *S. pneumoniae* exprimiert und hochreguliert wird [72], [73], [74]. Desweiteren zeigten Chauhan *et al.* (2009), dass die *in vitro* Immunabwehr von murinen Astrozyten und Mikroglia NOD2^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert ist, nachdem diese mit *N. meningitidis* stimuliert wurden [75]. In NOD2^{-/-}-Mäusen sind Astroglieose und inflammatorische Zytokinlevel innerhalb des zentralen Nervensystems während einer Meningokokken-Infektion reduziert. Sowohl die humanen als auch die murinen Daten belegen, dass NOD2 während einer bakteriellen Meningitis eine wichtige Rolle in der Generierung einer Entzündung mit verheerenden Folgen für das ZNS spielt [76].

1.1.3 Mechanismus zur IL-1 β -Ausschüttung – Das Inflammasom

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin der angeborenen Immunantwort, das im Körper starke Reaktionen hervorruft. Es trägt zur Vernichtung von Mikroorganismen durch Fieber bei sowie zur Th2- und Antikörper-Produktion. IL-1 β ist aber auch an Autoimmunreaktionen wie z.B. rheumatoide Arthritis, Muckle-Wells-Syndrom [77], [78], familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS) [79], neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID) bzw. chronic infantile neurologic, cutaneous, articular (CINCA) syndrome [80], [81] beteiligt, sowie an chronischer Entzündung, septischem Schock und Tod. Die Rolle von IL-1 β wird auch in Bezug auf die Hämatopoiese, Artherosklerose, Leukämie und der Entwicklung von soliden Tumoren diskutiert [82]. Die Gratwanderung zwischen Nutzen und Zerstörung ist bei diesem Zytokin offenbar. Einerseits wird das IL-1 β in hohen Spiegeln benötigt, um das eindringende Pathogen durch Temperaturerhöhung zu eliminieren. Andererseits führt eine zu lang erhöhte Temperatur zu Schäden des Gewebes, was vor allem im ZNS desaströse Folgen haben kann, aufgrund der lebenswichtigen neuronalen

Funktionen. Die Genexpression, Prozessierung, Reifung und Sekretion von IL-1 β ist daher ein streng regulierter Prozess, der mehrere Regulationsschritte beinhaltet [83]. Die mRNA-Synthese von ProIL-1 β benötigt ein erstes Signal, das bei bakterieller Invasion durch Liganden der bakteriellen Zellwand über extrazellulär exprimierte Toll-like Rezeptoren erfolgt. Durch LPS oder Lipoproteine (im Falle von TLR4 und TLR2) erfolgt dieses erste Signal und führt über eine Signalkaskade zur NF- κ B-Aktivierung und somit zur Expression von ProIL-1 β im Zytosol, das 34 kDa schwer ist und über 269 Aminosäuren verfügt. Ein zweites Signal wird benötigt, um proCaspase-1 in aktivierte Caspase-1 zu überführen, um (humanes) ProIL-1 β zu reifem IL-1 β (17,5 kDa) an der Position der Aminosäuresequenz Asp116-Ala117 post-translational zu schneiden. Dieses Protein verfügt nur noch über 153 Aminosäuren (N-117 bis 269-C). Caspase-1 hat wie alle Caspasen die bevorzugte Schnittstelle an Asparaginsäure [63]. Dieses zweite Signal gibt der bakterielle Ligand MDP oder extrazellulär zugeführtes ATP, um NOD2 bzw. NLRP3/NLRP1 zu aktivieren. Nach der Bindung des Liganden an die LRR-Domäne wird das NLR-Protein entfaltet und oligomerisiert durch die NACHT-Domäne. NLRP1, NLRP2 und NLRP3 gehören zur Subfamilie der NLRPs der Nod-like Rezeptoren (NLRs) und bilden das Grundgerüst des Inflammasoms [84]. Diese besitzen wie NOD2 eine 3-teiligen Domänenstruktur bestehend aus einer C-terminalen Liganden-erkennenden Domäne (LRR), einer Oligomerisations-Domäne (NACHT oder NBD/NAD) und, anders als bei NOD2 (CARD), einer N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD) [85], [86]. Nur NLRP1 besitzt zusätzlich noch eine FI-IND- und CARD-Domäne [60] (s. Abb. 4). Weitere Elemente des Inflammasom-Komplexes sind ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain), das eine PYD-Domäne besitzt und mit der PYD-Domäne der NLRPs interagiert [64]. Zusätzlich besitzt ASC eine CARD-Domäne, die an die CARD-Domäne von Caspase-1 binden kann. NLRP1 besitzt C-terminal eine CARD-Domäne, die mit der pro-inflammatorischen Caspase-5 oder einer weiteren Caspase-1 interagiert [87].

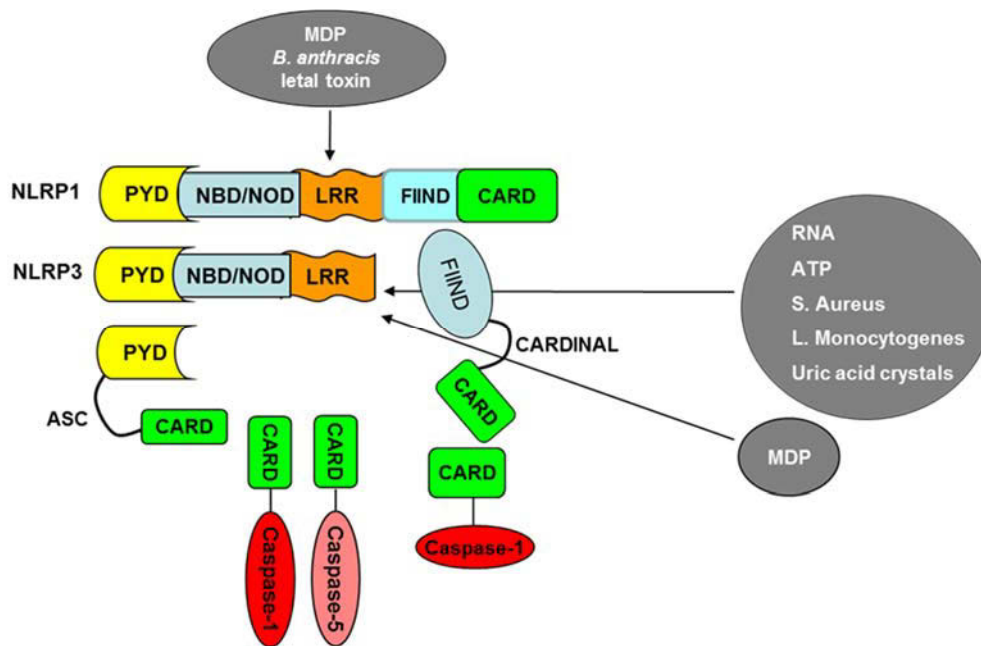


Abb. 4: Schema des zytosolischen Inflammasom-Komplexes am Beispiel von NLRP3 und NLRP1.

NLRPs bestehen aus drei Domänen, den C-terminalen Liganden-erkennenden LRRs (Leucin-rich repeats), der zentral-liegenden NACHT- und NBD-Domäne (Nukleotid-bindende Domäne) und der N-terminalen PYD-Domäne (Pyrin). NLRP1 besitzt zusätzlich eine CARD (caspase-recruitment domain)- und eine FIIND (function to find)-Domäne. NLRPs sind Teil der Pyrin-Superfamilie von death-domain fold Proteinen. Grau: exogene Liganden, die mit der LRR-Domäne der NLRPs interagieren. FIIND und ASC sind Adaptern, die mit ihren CARD-Domänen mit Caspase-1/5 und NLRP1 bzw. NLRP3 interagieren.

Diese intrazellulären Rezeptoren treten daraufhin mit ProCaspase-1 (404 AS) in Kontakt, das sich selbst (Cystein-Peptidase) in einem autokatalytischen Schritt zu aktiver Caspase-1 (88 AS, p10-Untereinheit) schneidet. Nun kann die Reifung zu IL-1 β erfolgen. Da reifem IL-1 β ein Signalpeptid zur Sekretion fehlt, kann es nicht auf klassischem lysosomal-exozytotischem Wege ausgeschüttet werden [88]. ATP wird am Ort der Entzündung aus sterbenden Zellen oder anderen inflammatorischen Zellen akkumuliert und aktiviert den P₂X₇-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen und allen Gliazellen, IL-1 β kann sezerniert werden [89]. P₂X₇ trägt auch zur IL-1 β -Prozessierung und Sekretion ohne bakterielle Inavasion bei. Dabei wird ein hypotones Milieu geschaffen, indem durch gleichzeitigen K⁺-Efflux nach ATP-Aktivierung aktive Caspase-1 gebildet werden und somit proIL-1 β zu reifem IL-1 β prozessiert werden kann [90]. Damit ist das zweite Signal unabhängig von eindringenden Pathogenen und somit NOD-unabhängig. Der Kationen-Kanal Pannexin-1 kann durch ATP-abhängige P₂X₇-Rezeptoraktivierung aktiviert werden und die Caspase-1-

Aktivierung und IL-1 β -Sekretion in den extrazellulären Raum stattfinden [91]. Die Gruppe um Marina-Garcia *et al.* fand heraus, dass dieser Kanal auch MDP ins Zytosol schleusen kann [66]. Ein weiterer Plasmamembran-Transporter, hPepT1, vermittelt MDP in das Zytosol, wo es von NLRs erkannt wird [92]. Auch die Proteine Clathrin und Dynamin tragen zur Einschleusung von MDP bei, indem sie die Zellmembran einstülpen und so Makromoleküle über Vesikel in das Zytosol transportieren [93].

Makrophagen und dendritische Zellen sind physiologisch gesehen die Hauptquellen für sezerniertes IL-1 β [82]. Diese Zwei-Schritt-Stimulation, in der Caspase-1 aktiviert wird, hat zur Folge, dass weit mehr reifes IL-1 β sezerniert wird als wenn nur LPS allein den TLR4-Rezeptor triggert. Durch LPS allein wird ProIL-1 β im Zytosol nur akkumuliert aber nicht prozessiert und sezerniert. Die Toll-like Rezeptoren und Nod-like Rezeptoren einer Zelle können somit in synergistischer Weise miteinander interagieren, um maximales IL-1 β auszuschütten [94]. Andererseits können humane Monozyten und auch die humane Zelllinie THP1 große Mengen an reifem IL-1 β nach dem ersten Stimulus mit LPS allein ausschütten [95]. Ferrari *et al.* (1997) postulieren, dass endogenes ATP in Makrophagen und Mikroglia zur IL-1 β -Reifung beiträgt, nachdem vorher mit LPS stimuliert wurde [96]. Publikationen die über TLR-und NLR-Synergismen und IL-1 β -Expression und Reifung berichten, beobachteten diesen Mechanismus in murinen dendritischen Zellen [97], humanen oralen Epithelzellen [98] und humanen mononukleären Zellen [70].

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal der TLR/NLR-Synergismus in Bezug auf die IL-1 β Expression und Sekretion in Zellen des ZNS, murinen und humanen Astrozyten und Mikroglia, untersucht sowie der TLR/NLR-Synergismus unter Einfluss von Östrogen auf primäre murine Peritonealmakrophagen und RAW267.4 Zellen.

1.1.4 Alternative Mechanismen zur IL-1 β -Regulation

Die am besten charakterisierte Protease zur IL-1 β -Prozessierung ist Caspase-1. Wenn jedoch die Caspase-1 inhibiert wird, ist die inflammatorische Arthritis um 50% reduziert [99]. Caspase-1 ist nicht das einzige IL-1 β -schneidende Enzym (ICE, IL-1 β -converting enzyme), es gibt einige Serin-Proteasen, die den IL-1 β -Vorläufer an verschiedenen Stellen proteolytisch schneiden können (Abb. 5). In den Granula von Neutrophilen befinden sich die Enzyme neutrophile Elastase, Proteinase-3 und Cathepsin G. In Mastzellen finden sich

Chymase und Cathepsin G. Hinzu kommen noch die Enzyme Chymotrypsin, Trypsin, Plasmin, *S. aureus*-Protease und die MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) Stromelysin-1, Gelatinase-A und B in anderen Zellen. Astrozyten und Mikroglia verfügen ebenfalls über Proteasen und können somit einen NOD2- und Caspase-1-unabhängigen Weg einschlagen, um IL-1 β zu prozessieren und zu sekretieren [100]. Warum verschiedene Zelltypen mehrere alternative Mechanismen zur IL-1 β -Prozessierung besitzen ist noch nicht ganz aufgeklärt. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese vielfältigen Mechanismen in jedem Fall dafür sorgen, dass dieses für die Wirts-Immunantwort essentielle Zytokin sezerniert wird, auch wenn ein Mechanismus ausfällt.

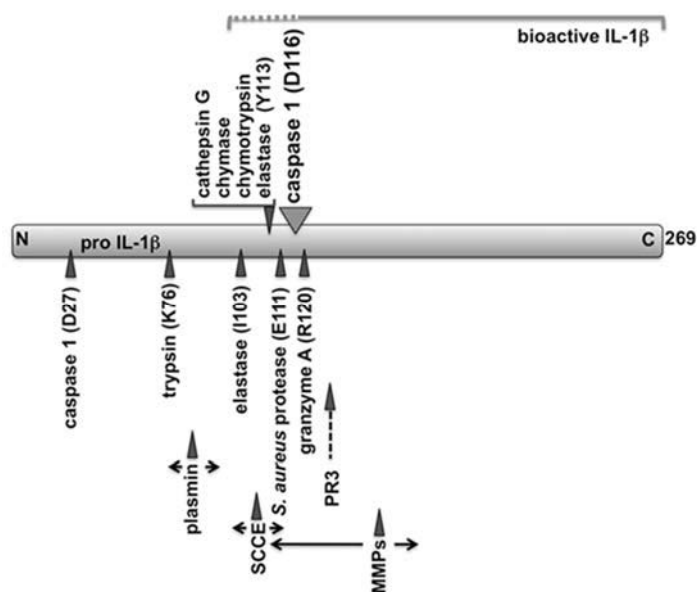


Abb. 5: Multiple IL-1 β -schneidende Enzyme.

Enzyme, die zur alternativen IL-1 β -Prozessierung beitragen. IL-1 β wird als 269 AS langes Vorläuferprotein gebildet. An verschiedenen Stellen der AS-Kette können Proteasen proIL-1 β in die mehr oder weniger bioaktive Form schneiden (Graphik aus [100]).

1.2 Zellen des Gehirns mit Immunfunktion

1.2.1 Mikroglia

Mikroglia entstammen dem myeloiden Phagozytensystem und sind mesodermalen Ursprungs. Dieser Zelltyp wurde zuerst 1919 von Pío del Río-Hortega, einem Schüler von Santiago Ramón y Cajal, beschrieben als eine Zellpopulation, die sich von den klassischen Astroglia und Neuronen unterscheidet [101]. Sie entstehen aus dem mittleren Keimblatt des Embryoblasten und invadieren das Gehirn in zwei Phasen während der Entwicklung

[102]. Die erste erfolgt während der fetalen Entwicklung (beim Menschen in den ersten zwei Trimestern, bei Nagetieren in der Embryonalphase zwischen dem 10. und 19. Tag). Die zweite Mikroglia-Population invadiert das Gehirn in den ersten postnatalen Tagen. Sie haben monozytäre Eigenschaften und stammen vermutlich von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Blut ab. Die Aufgabe der Mikroglia ist es, konstant ihre Umgebung zu überwachen [103]. Mit verzweigten (ramifizierten) Fortsätzen und Filopodium-ähnlichen Vorsprüngen scannen sie im gesunden ZNS nach Mikroläsionen, eindringenden Pathogenen oder abnormen Serumkomponenten, die von Neuronen ausgehen und können sich amöboid bewegen [104], [105]. In dieser absuchenden Form besitzen sie heterochromatinreiche Zellkerne. Mikroglia innerhalb des ZNS-Parenchyms sind an den meisten Krankheiten, die im ZNS vorkommen, beteiligt [106]. Sie wechseln vom scannenden in den reaktiven Phänotyp, indem sie schneller proliferieren und stärker verzweigte Fortsätze ausbilden. Sie akkumulieren an der Stelle des Gewebeschadens (durch Pathogene oder Neurodegeneration) und exprimieren entzündungsbedingte Gene, wie z.B. pro-inflammatorische Zytokine, Enzyme, Adhäsionsmoleküle und freie Radikale [107], [108]. Lange galt die LPS-Stimulation als der Gold-Standard zur Mikrogliaaktivierung. Die Stimulation simuliert eine Infektion mit Gram-negativen Bakterien und produziert eine massive pro-inflammatorische, antimikrobielle Verteidigungsreaktion, was dazu führte, dass Mikroglia nur noch als neurotoxisch und pro-inflammatorisch wahrgenommen wurden. Sie haben im gesunden Szenario wahrscheinlich die Aufgabe der Stabilisierung des ZNS [109]. Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs), detektieren und erkennen ähnlich den Makrophagen virale, bakterielle oder parasitäre Strukturen (Liganden) und exprimieren proinflammatorische Mediatoren [110], [111]. Mikroglia exprimieren TLR1-9 [112], [113]. Auch der intrazelluläre Rezeptor NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-2) wird in primären murinen Mikroglia konstitutiv exprimiert und wird nach Exposition mit *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis* und Peptidoglykan MDP hochreguliert [72], [75].

1.2.2 Astrozyten

Astrozyten sind neuroektodermalen Ursprungs und versorgen neuronale Zellen unter anderem mit Pyruvat, Laktat und neurotrophen Faktoren [114]. Sie begünstigen die Synapsenbildung der neuronalen Zellen aus Stammzellen [115] und spielen eine wichtige

Rolle im Glutathion-Metabolismus und im Metabolismus der reaktiven Sauerstoff-Spezies [116], [117]. Werden Astrozyten einer bakteriellen Invasion ausgesetzt, reagieren sie darauf mit einer proinflammatorischen Zytokin-Expression ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IFN- γ), einer Chemokin-Expression (CCL2, CCL5) und der Ausschüttung neurotrophischer Faktoren (NGF, VEGF, IGF1), wodurch Nachbarzellen (Neurone, Mikroglia, Oligodendrozyten, weitere Astrozyten) aktiviert werden und diese die initiale angeborene Immunreaktion weiter amplifizieren. Desweiteren werden Leukozyten durch eine modifizierte Blut-Hirn-Schranke-Permeabilität zum Ort der Entzündung rekrutiert (durch Chemokine CXCL 10, CCL2), wo sie eine adaptive Immunreaktion einleiten [118], [119]. Diese als Astrogliose bezeichnete Reaktion auf Krankheit und Verletzung wird in verschiedene Schweregrade eingeteilt [120]. Andererseits vermitteln CCL2 und CCL12 Neuroprotektion, z.B. durch die Migration von neuronalen Vorläuferzellen im sich entwickelnden Gehirn [121] und zu Orten wo eine Gehirnverletzung vorliegt [122], [123]. Astrozyten exprimieren Toll-like Rezeptoren, vor allem TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9 [113], [124], [125], [126]. Auch NOD-like Rezeptoren werden exprimiert. NOD2 wird konstitutiv in isolierten murinen Astrozyten exprimiert und nach Infektion mit *N.meningitidis* und *B. burgdorferi* hochreguliert [75]. Demnach sind Astrozyten immunkompetente Zellen, da sie verschiedene PRRs besitzen, die an der ersten Erkennung von mikrobiellen Bestandteilen bzw. endogenen Danger-Signalen involviert sind. Sie fördern einerseits eine Entzündungsreaktion durch NF- κ B-abhängige Signalwege und andererseits begrenzen sie Verletzungen und stellen die Hirn-Homöostase wieder her.

1.3 Die bakterielle Meningitis

Neben Viren (u.a. *Enterovirus*, *HSV*, *Morbillivirus*), Pilzen (*Cryptococcus*) und Parasiten (u.a. *Naegleria fowleri*), die für diverse Enzephalitiden verantwortlich sind, sind bakterielle Pathogene höchst lebensbedrohlich, da sie durch die Entzündung von Gehirn und Rückenmark schwere Langzeitfolgen (Taubheit, Epilepsie, kognitive Beeinträchtigung) bzw. Tod verursachen [127], [128], [129], [130]. Hauptverursacher sind v.a. *Haemophilus influenzae* Typ B, *Streptococcus pneumoniae* und *N. meningitidis* bei Kindern und Erwachsenen, sowie *Escherichia coli* K1 und *Streptococcus agalactiae* bei Neugeborenen. Sie gelangen in den Blutstrom, passieren die Blut-Hirn-Schranke und erreichen so ihren Zielort, die Meningen [131], [132]. Früher verursachte *H. influenzae* 48% aller Meningitis-

Fälle in den USA. Durch das Hib-Impfprogramm konnte diese Zahl auf 7% in den USA (ähnliche Werte in Europa, Brasilien, Israel und Kanada) reduziert werden [133].

Das Hirnparenchym ist von Meningen umgeben (Abb. 6). Die Meningen bestehen aus drei Schichten: direkt unter dem Schädelknochen liegt die Dura mater (harte Hirnhaut), gefolgt von der Arachnoidea (Spinnhaut) sowie der Pia mater (innere Hirnhaut), die direkt dem Cortex und dem Rückenmark bis L1/L2 aufliegt. Die letzten beiden Schichten werden auch als Leptomeningen bezeichnet. Diese stellen ein natürliches Hindernis gegen Hirninvasion und Tumorzellen dar [134]. Zwischen dem Arachnoid und der Pia mater liegt der Subarachnoidalraum, der beide Schichten über Trabekel miteinander verbindet [135].

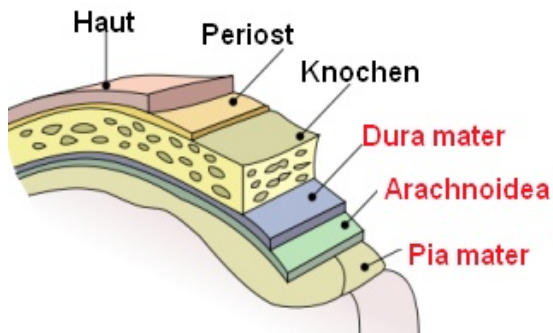


Abb. 6: Hirn- und Rückenmarkshäute (Meningen). Die Dura mater liegt eng an Knochen von innen an. Arachnoidea liegt innen der Dura mater an. Zwischen Dura mater und Arachnoidea liegt der Subduralraum. Pia mater bedeckt Gehirn und Rückenmark. Periost – Knochenhaut. (heilberufe-ausbildung.de)

Während einer Entzündung können hohes Fieber, ausgelöst durch pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-8) als Antwort auf die bakterielle Invasion im Subarachnoidalraum auftreten; Ödeme und Hirnschwellungen werden zur Gefahr für den Patienten [136]. Symptome einer bakteriellen Meningitis sind vielfältig. Sie reichen über hohes Fieber, Tachykardie, Übelkeit und Lethargie bis zu typischen Zeichen einer Meningitis, Lichtempfindlichkeit, Nackensteife und positives Kernig- oder Brudzinski-Zeichen [137]. Als Langzeitfolge können Hörverlust und neuropsychologische Störungen in 20% aller weltweiten Fälle auftreten [138], [139]. Ein dramatischer Unterschied zwischen den Meningitis-Fällen mit Todesfolge besteht zwischen den Industriestaaten und den LDC-Staaten (Least developed countries). Ungefähr 50% der Kinder mit Pneumokokken-Meningitis sterben in LDC-Staaten und 60% der Überlebenden leiden an Spätfolgen der Erkrankung [140]. In den Industriestaaten liegt die Mortalität bei 10% und 30% erleiden Spätschäden [140].

1.3.1 Meningokokken-Meningitis

Morphologie

Die Meningokokken-Meningitis wird unter anderem vom Bakterium *N. meningitidis* ausgelöst. Es handelt sich um Gram-negative, aerobe, Oxidase-positive Diplokokken. Kolonien von *N. meningitidis* erscheinen grau und unpigmentiert auf Blutagarplatten und haben eine runde, leicht glänzende Oberfläche. Sie lassen sich 18-24 h bei 37°C und 5 % CO₂ auf Blutagarplatten kultivieren.

(<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt07-id-characterization-nm.html>)

Die Zellwand Gram-negativer Bakterien (Abb. 7) besteht aus einer dünnen Peptidoglykanschicht (MDP-enthaltend). Darauf liegt die äussere Zellmembran, die Innenseite besteht aus Phospholipiden. Lipopolysaccharid (LPS) ist der Hauptbestandteil der äusseren Schicht der äusseren Zellmembran der meisten Gram-negativen Bakterien. Es besteht aus Lipid A, einem Kern-Oligosaccharid (core) und einer O-spezifischen Oligosaccharid-Kette (O-Antigen), die sich je nach Bakterienart unterscheidet [141].

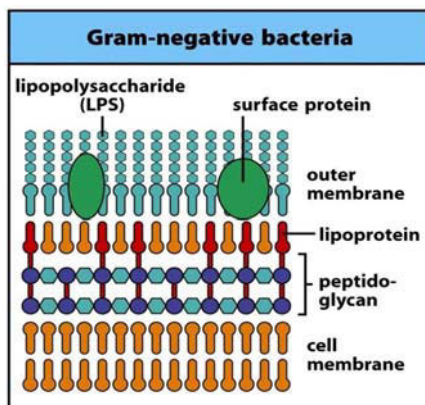


Abb. 7: Zellwand eines Gram-negativen Bakteriums.

Die Zellwand besteht aus einer Doppelmembran. In der äusseren Membran befindet sich der Lipopolysaccharid-Teil, der nur bei Gram-negativen Bakterien vorhanden ist (Immunobiology 7th ed. © Garland Science 2008)

Neisserien besitzen in ihrer Zellwand statt LPS Lipooligosaccharide (LOS), das sich im Fehlen der O-spezifischen Oligosaccharid-Kette (O-Antigen) auswirkt. Dennoch wird LOS in Makrophagen auch vom Toll-like Rezeptor 4 als PAMP erkannt [142].

Epidemiologie

Das Bakterium ist im Stande, große Epidemien auszulösen. Es wurden bisher 12 Serogruppen von *N. meningitidis* identifiziert, wovon sechs zu Epidemien führen können: A, B, C, W-135, X und Y. Die geographische Verteilung und das epidemische Potential variieren je nach Serogruppe, wobei B, C, Y und W-135 in den USA und LCD-Staaten vorkommen [143], [144] und Serogruppe A vor allem im Meningitis-Gürtel der Sub-Sahara vorkommt [144]. Die Serogruppe B herrscht vor allem in Europa und Latein-Amerika vor [145].

Kolonisation

Die Transmission der Bakterien erfolgt über Tröpfcheninfektion von Person zu Person und die Inkubationsdauer beträgt im Durchschnitt 4 Tage, wobei sie von 2 bis 10 Tagen variieren kann. Desweiteren kann *N. meningitidis* im Nasopharynx bei gesunden Menschen persistieren, ohne eine Infektion auszulösen. Bei ungefähr 10-20 % der Menschen kolonisiert *N. meningitidis*, während Epidemien kann die Zahl erhöht sein [146]. Unter immunsuppressiven Zuständen und bei Kolonisation von sogenannten „hyperinvasiven“ Stämmen [147], kann das Bakterium die Immunantwort in der Mucosaschicht des Nasen-Rachenraums überwinden und Zugang zum Blutstrom finden. Somit gelangt es über die Gehirn-Endothelzellen (BMEC) der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Sie können nach vorausgehender Anhaftung an die Endothelzellen mit ihren Typ IV Pili einer hohen Blutströmungsgeschwindigkeit widerstehen, sich vermehren und Mikrokolonien an der apikalen Oberfläche der Zellen bilden [148]. Die Überwindung der Endothelzellen erfolgt durch parazelluläre Passage über offene tight junctions [149].

Um sich vor Phagozytose des Wirts zu schützen, ist das Bakterium bekapselt. Somit umgeht es die Konvertase (Serinprotease) des Komplementsystems der Wirts-Immunabwehr [150]. Das Bakterium interagiert nur mit humanen Zellen, da sie die Eisenressourcen Transferrin und Lactoferrin nutzen.

Symptome und Diagnostik

Die gewöhnlichsten Symptome einer Meningokokken-Meningitis sind ein steifer Nacken, hohes Fieber, Licht-Überempfindlichkeit, Konfusion, Erbrechen und Kopfschmerz [140]. Innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Erstellen der Diagnose und Beginn der Symptombehandlung sterben 5-10% der Patienten, vor allem an einer Bakteriämie, der Meningokokken-Sepsis, die mit hämorrhagischen Blutungen und Kreislaufkollaps einhergeht [151].

Auch das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom kann auftreten, was bei den Patienten zu einer Nebennierenapoplexie führt [152], [153], [154]. Beim Zerfall des Bakteriums werden in hohem Maße Endotoxine freigesetzt, die u.a. zur Aktivierung des Gerinnungssystems führen und somit Thromben in Blutgefäßen bilden und TLRs aktivieren, um Zytokine freizusetzen [155]. Spätkomplikationen der Meningokokken-Meningitis sind bei 10-20 % der Patienten Hörverlust, Entwicklungsstörungen, Teil-Nekrosen der Haut und Hirnschäden. Am schnellsten lässt sich eine Meningokokken-Meningitis durch die Isolation des Bakteriums aus einer sterilen Körperflüssigkeit, z.B. Liquor durch Lumbalpunktion, bestimmen. Behandelt wird mit Antibiotika, z.B. Cefotaxim oder Ceftriaxon, den dritte-Generation-Cephalosporinen [156].

Prophylaxe

Präventiv kann gegen Meningokokken geimpft werden, es stehen drei verschiedene Vaccine zur Verfügung: Polysaccharid-Vakzine werden weltweit seit 30 Jahren eingesetzt. Es gibt sie in bivalenter (Serogruppen A und C), trivalenter (Serogruppen A, C und W135) und tetravalenter (A, C, Y und W135) Form. Seit 1999 ist ein Konjugat-Vakzin gegen Serogruppe C und seit 2005 ein tetravalentes Konjugat-Vakzin gegen die Serogruppen A, C, Y und W135 in Canada, den USA und Europa zugelassen. Im afrikanischen Meningitis-Gürtel (Sahel-Zone: Burkina-Faso, Mali, Niger, Sudan) wurde 2010 ein Konjugat-Vakzin gegen Serogruppe A eingeführt („MenAfriVac“), was bis heute zu den niedrigsten Meningitis A-Fällen führte, die während einer epidemischen Saison auftraten. Lange dachte man, dass gegen die Serogruppe B kein Polysaccharid-Impfstoff entwickelt werden kann, da es zu stark den Polysacchariden in neurologischem Gewebe des Menschen ähnelt (biologische Mimikry). Seit 2013 gibt es einen Impfstoff gegen Meningitis B, dieser ist jedoch von der STIKO noch nicht empfohlen worden.

(http://www.rki.de/DE/Content/-Infekt/EpidBull/Archiv/2014/36/Art_02.html 2014).

1.3.2 Meningitis durch *S. pneumoniae*

Morphologie

Ausgelöst wird die Pneumokokken-Meningitis durch *S. pneumoniae*, einem Gram-positiven, Oxidase- und Katalase-negativem Bakterium, das in Diplokokkenform auftritt. *S. pneumoniae* gehört zu den α -hämolytischen Streptokokken und lebt in fakultativ anaerobem Milieu.

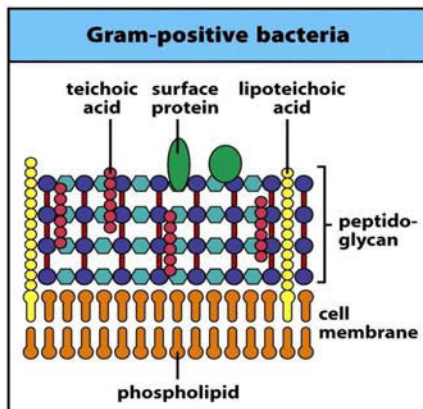


Abb. 8: Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums.

Die relativ dicke Peptidoglykanschicht wird von Teichonsäuren durchzogen. Die Lipoteichonsäuren reichen in die Zyttoplasmamembran hinein. (Immunobiology, 7th ed. © Garland Science 2008)

Die Zellwand Gram-positiver Bakterien besitzt eine relativ dicke Mureinschicht und Teichonsäuren durchziehen die äussere Zellmembran (Abb. 8) [157]. Die Minimalstruktur der Mureinschicht ist auch bei Gram-positiven Zellen MDP. Lipopeptide von *S. pneumoniae* werden von den Immunzellen des Wirtsorganismus durch TLR2 erkannt.

Kolonisation

Auch *S. pneumoniae* adhärirt und kolonisiert im Nasopharynx, bevor eine Meningitis ausbricht. Pneumokokken exprimieren dafür bis zu 500 unterschiedliche Oberflächenproteine, u.a. das Adhäsionsprotein Phosphorylcholin und das Kolonisationsprotein Neuraminidase [158]. Die Invasion erfolgt einerseits durch die Schleimhaut in den Blutstrom, andererseits auch über die Lungenalveolen in den Blutstrom. Damit der Mikroorganismus dem Wirts-Immunsystem entkommt, besitzt er eine Polysaccharidkapsel als wichtigsten Virulenzfaktor [159]. Auch das Bakterientoxin Pneumolysin trägt u.a. zur Virulenz bei, indem es den Fc-Teil des IgG bindet, um die Opsonierungsaktivität des Wirts zu verringern [160], [161]. Um die Meningen zu erreichen, muss das Pathogen aus dem Blutstrom die physiologische Barriere zum ZNS überwinden [162]. Studien zeigen, dass sich der bevorzugte Eintrittsort von *S. pneumoniae* um die leptomeningealen Blutgefässe herum befindet [163], [164] und

dort den Weg durch die Endothelzellen nimmt, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [165], [166]. Wenn das Bakterium im ZNS angekommen ist, kann das bekapselte Pathogen in Ruhe proliferieren, da eine Immunantwort durch Leukozyten, Komplementfaktoren und Immunglobuline im sterilen Milieu der Zerebrospinalflüssigkeit erst mal nicht vorkommt [167], [168]. Die Transmigration von Leukozyten in die Zerebrospinalflüssigkeit erfolgt erst nach bakterieller Multiplikation und auch dann erfolgt keine effektive Phagozytose, da Opsonierungsfaktoren und Immunglobuline in der Zerebrospinalflüssigkeit eher niedrig sind. Trotzdem können Zellwandbestandteile des Pathogens von Muster-erkennenden Rezeptoren residenter Zellen (Mikroglia, Astrozyten) erkannt werden und somit zu einer Immunantwort beitragen. Die angeborene Immunantwort auf eine Pneumokokken-Infektion im Gehirn ist abhängig von TLR2 und TLR4 [169], [170]. Ähnlich wie die TLR4-Antwort in Bezug auf LPS, wird das TLR2-Signaling gegen *S. pneumoniae* im Corpus Callosum und in den Meningen initiiert. Viele TLR2-exprimierende Zellen befinden sich im Gehirn-Parenchym und TLR2-Defizienz wird mit erhöhter TNF- α Expression während einer Pneumokokken-Meningitis assoziiert [171]. Auch die zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren NOD1 und NOD2 werden in der Pathogenerkennung mit *S. pneumoniae* in Verbindung gebracht [172], [173].

Therapie

Antibiotika erster Wahl sind auch gegen *S. pneumoniae* Cefotaxim und Ceftriaxon, in Kombination mit Vancomycin, da sich Penicillin-Resistenz in dieser Bakterienart ausbreitet [174].

Prophylaxe

Ein 23-valenter Polysaccharid-Impfstoff, der etwa 74-90% aller Serotypen abdeckt, wird bei Kindern ab zwei Jahren und bei älteren Patienten (> 60 Jahre) eingesetzt. Für Kinder unter zwei Jahren wurde ein 7- (PCV7), 10- und 13- (PCV13) valenter Konjugat-Impfstoff entwickelt, der die Inzidenz der invasiven Pneumokokken-Meningitis von 23 im Jahr 2005 (nach Einführung von PCV7) auf 13 Fälle von 100.000 im Jahr 2012 sinken ließ (nach Einführung von PCV13) [175], [176].

1.4 Der Einfluss von Östrogen auf das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem ist durch ein Netzwerk aus Signalmolekülen, zu denen Zytokine, Chemokine und Hormone zählen, in das endokrine System integriert. Eine Konsequenz dieser Interaktion ist eine zweigeteilte Immunantwort, bei der Frauen eine höhere Konzentration an zirkulierenden Immunglobulinen und eine stärkere Antikörperantwort (humoral) nach Impfung und Infektionen besitzen als Männer bzw. Männchen, wie in verschiedenen Spezies beobachtet werden kann [177], [178]. Östrogene modulieren die Immunantwort, indem sie die Zytokin- und Chemokinproduktion beeinflussen. Auch die Lymphozytenentwicklung, Reifung und Selektion sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen und HLA-Rezeptoren steht unter diesem Einfluss. Diese Effekte resultieren entweder durch direkte Bindung des Hormons an einen Rezeptor (Östrogenrezeptor α und β) auf den Immunzellen, z.B. Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen oder indirekt indem das Hormon auf somatische Zellen einwirkt am Ort der Lymphozytenreifung und –entwicklung, z.B. Knochenmark, Thymus und Milz [179], [180]. Das Potential der Geschlechtshormone auf das Immunsystem einzuwirken ist besonders gross während der Schwangerschaft, wenn hohe Östrogen und Progesteronwerte den Fetus („hemiallograft“) vor einer Abstoßung schützen, indem höhere Ig-Werte (IgM und IgG) induziert werden. Jedoch besteht bei Frauen neben der erhöhten Immunreaktion dadurch auch die erhöhte Gefahr, Autoimmunerkrankungen zu entwickeln [181], [182], [183].

Die Arbeitsgruppe von Maya Saleh *et al.* fand heraus, dass murine Caspase-12 die Caspase-1 Aktivierung im Immflammasom inhibiert [184]. Yeretssian *et al.* zeigen, dass in weiblichen Mäusen die Expression des menschlichen anti-inflammatorischen Caspase-12 Gens blockiert ist. Es konnte dargestellt werden, dass der Östrogenrezeptor direkt an das Caspase-12-Gen bindet und so die Expression blockiert. Somit konnte Caspase-1 nicht inhibiert werden und eine erhöhte Immunantwort gegenüber *Listeria monocytogenes* wurde beobachtet. Bei Männchen fehlt der Östrogenrezeptor und die Expression von Caspase-12 führte zu einer Hemmung der Entzündungsreaktion (u.a. Caspase-1) und es kam zu einer Infektion mit dem enteropathischen Krankheitserreger *L. monocytogenes* [185]. Das Östrogen hat anscheinend einen positiven Einfluss auf die Immunabwehr gegen Pathogene, wahrscheinlich, um das weibliche Geschlecht u.a. während einer Schwangerschaft vor Infektionen zu schützen.

Das Geschlecht hat einen signifikanten Einfluss auf die Immunantwort während einer Infektion [186]. Das Hormon Testosteron hat einen anti-inflammatorischen Effekt auf das Immunsystem, indem es die Antikörperproduktion, die mRNA-Expression der induzierten Nitritoxid-Synthase (iNOS) sowie die Degranulation von Eosinophilen verringert, während Östrogen diese Funktionen verstärkt und damit pro-inflammatorisch wirkt [186]. Andererseits haben Männer eine verringerte Zell-vermittelte Immunantwort während einer Sepsis und somit eine schlechtere Prognose als Frauen, deren Östrogen während einer bakteriellen Sepsis protektiv wirkt [187]. Allgemein berichten McGowan *et al.* (1975) über eine signifikant erhöhte Inzidenz bakterieller Infektionen bei Männern als bei Frauen [188]. Der immunsuppressive Effekt des Testosterons hat aus evolutionärer Sicht auch einen Vorteil, um das Immunsystem in gewissen Situationen auszuschalten. Kastrierte Mäuse, die mit exogenem Testosteron behandelt wurden, zeigten eine verringerte Suszeptibilität gegenüber LPS-induziertem septischem Schock [189]. Da männliche Individuen ein höheres Risiko für ein Trauma besitzen als weibliche Individuen, kann dieser positive Effekt des Testosterons die Konsequenzen der reduzierten Immunantwort gegenüber einer Infektion ausbalancieren [190]. Wichtig bei diesen Untersuchungen zu Geschlechtsunterschieden in der Immunantwort ist der Zeitpunkt der Erhebung in Bezug zum Östrogenzyklus bzw. Alter der Frau. Frauen in der Menopause profitieren wahrscheinlich nicht mehr vom protektiven Effekt des Östrogens [187]. Die unterschiedlichen hormonellen Reaktionen auf das Immunsystem hängen auch stark vom eingewanderten Pathogen selbst ab. Nicht jede bakterielle oder virale Infektion resultiert in einer erhöhten Suszeptibilität des einen Geschlechts oder anderen Geschlechts [191]. *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) Bakteriämien kommen häufiger bei Männern als bei Frauen vor [192], [193], [194] (Studien aus Dänemark, Kanada und den USA).

Entgegengesetzt dazu berichtet die Gruppe um Laupland *et al.* (2008), dass *Escherichia coli*-Bakteriämien mehrheitlich bei Frauen vorkommen [195]. Die Gruppe um Kadioglu *et al.* (2011) untersuchte Geschlechtsunterschiede zur Suszeptibilität von *S. pneumoniae* bei Mäusen und kam zu dem Ergebnis, dass männliche Mäuse eine höhere Bakterienlast in der Lunge, sowie höhere pro-inflammatorische Zytokinlevel und eine höhere Mortalitätsrate aufweisen als weibliche Mäuse [196]. Dieser Geschlechtsdimorphismus kommt auch vor, wenn das Immunsystem mit PAMPs konfrontiert wird.

1.5 Arbeitshypothesen

1. Findet die TLR-NLR-Synergie in Astrozyten und Mikroglia statt und trägt NOD2 zur Caspase-1-Aktivierung bei?

Die Untersuchung von Mikroglia und Astrozyten auf die Regulation der IL-1 β -Sekretion während einer simulierten bakteriellen Meningitis wird in dieser Arbeit vorgenommen. Dabei wird experimentell erforscht, ob und wie Toll-like Rezeptoren und Nod-like Rezeptoren durch bakterielle Zellwandbestandteile stimuliert werden, um IL-1 β synergistisch, unter Aktivierung von Caspase-1, in hohen Konzentrationen zu exprimieren. IL-1 β ist an vielen entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die einzelnen Schritte der IL-1 β -Reifung und IL-1 β -Sekretion zu verstehen, um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können.

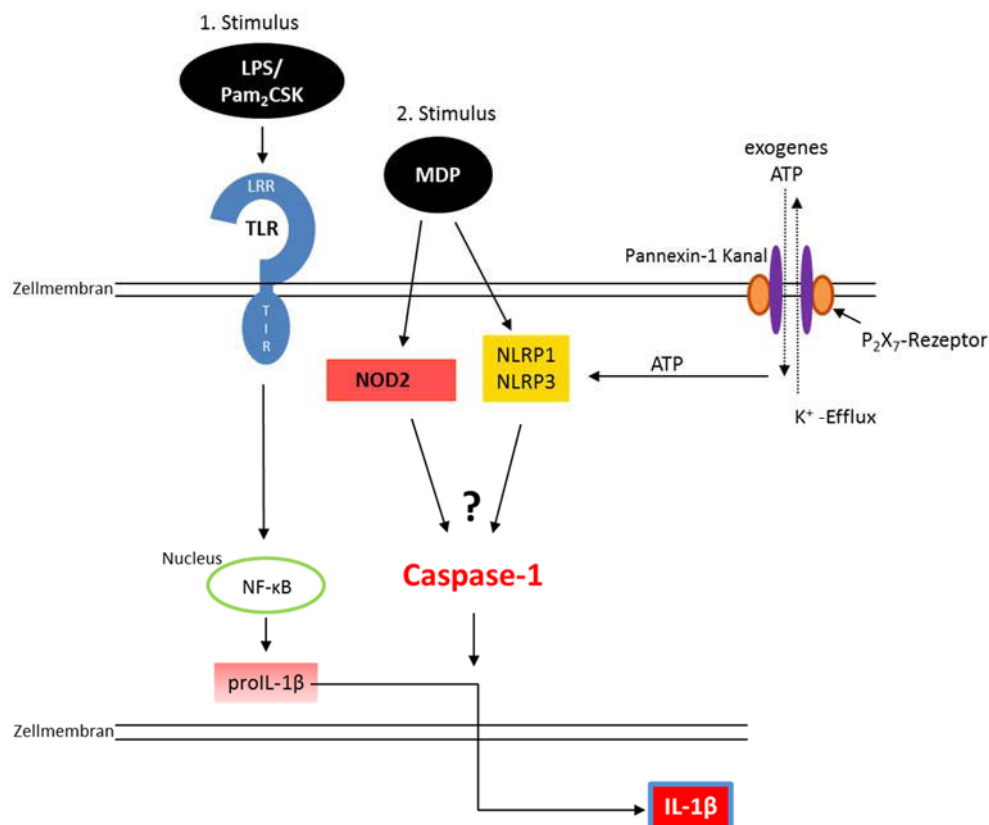


Abb. 9: Schema des Signalwegs zur IL-1 β -Reifung.

Der erste Stimulus zur TLR-Aktivierung und proIL-1 β -Expression via NF- κ B ist bereits für viele Zelltypen untersucht worden. Elusiv bleibt der zweite Signalweg, ob NOD2, neben dem Inflammation, an der Caspase-1-Aktivierung in Astrozyten und Mikroglia beteiligt ist.

2. Welchen Einfluss hat Östrogen auf die TLR-NLR-Synergie in Makrophagen?

RAW267.4 Peritonealmakrophagen-Zelllinie werden in Östrogen vorinkubiert, um dann das Nod2-Gen per knock-down auszuschalten. Eine Stimulation mit bakteriellen Zellwandbestandteilen zur TLR-und NLR-Aktivierung erfolgt und die Unterschiede in der IL-1 β -Antwort werden gemessen. In primären adulten WT-und NOD2^{-/-}-Maus-Peritonealmakrophagen werden zum ersten Mal die Unterschiede in der IL-1 β -Antwort nach TLR/NLR-Stimulation bei männlichen und weiblichen Tieren erfasst.

2 Material und Methoden

2.1 Humaner und muriner IL-1 β -ELISA

Eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc) wurde mit 2 μ g/ml monoklonalem anti-human IL-1 β -Antikörper (MAB601, R&D Systems) oder anti-mouse IL-1 β -AK (MAB401, R&D Systems) und in Coating-Puffer (NaHCO₃-Puffer, 1:250) beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Löcher mit PBS-T (Phosphat-buffered Saline incl. Tween 20 (PBS-T, Roth)) zur Entfernung des Primär-(Capture) Antikörpers mussten die noch freien Bindungsstellen mit Blockierpuffer gesättigt werden. Das Blocken der freien Antigene erfolgte für 1h bei Raumtemperatur (RT) in Tris-buffered Saline inkl. Tween 20 (TBS-T, Roth) und 2,5 % fetales Rinderserum (FCS). Nach dreimaligem Waschen der Löcher mit PBS-T wurden 50 μ l pro Loch der zu analysierenden Überstände aufgetragen sowie eine Standardreihe mit rekombinantem humanem IL-1 β als Referenz (1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml (Cell Signaling)). Im Falle der murinen Zellüberstände wurde eine Standardreihe mit rekombinantem murinem IL-1 β (2000 pg/ml bis 15,6 pg/ml) aufgetragen. Alle Proben wurden in Doppelwerten aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-T wurden 400 ng/ml des biotinylierten, polyklonalen humanen Detektionsantikörpers IL-1 β (BAF201, R&D Systems) oder des biotinylierten, polyklonalen murinen IL-1 β -Antikörpers (BAF401, R&D Systems) in Blockierungspuffer (1:125) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurde 1 mg/ml des Proteins Horseradish-peroxidase (HRP-) Streptavidin (Peprotech) hinzupipettiert (1:1000), um den 2. Antikörper zu markieren. Die Immunokomplexe wurden kolorimetrisch durch Tetramethylbenzidine (TMB-) Lösung (Seramun blau® slow) detektiert, das zu 100 μ l in die Löcher pipettiert wurde. Die Farbumwandlung des Komplexes im Dunkeln bei RT wurde nach ungefähr 10 Minuten mit 50 μ l 1M H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm in einem Mikrotiterplatten-Gerät (Tecan, Programm Magellan) gemessen. Es wurde die optische Dichte bestimmt und gleichzeitig die IL-1 β -Proteinkonzentration in pg/ml.

2.2 Muriner IL-6-ELISA

Ausführlich wird das Prinzip des ELISA unter 2.1 beschrieben, weshalb der IL-6 ELISA zusammengefasst wird:

1. Beschichten der Mikrotiterplatte mit dem monoklonalen Primärantikörper mIL-6 (BD Pharmingen) in Coatingpuffer (1:250), mind. 12 h bei 4°C, danach 3x waschen
2. Blocken der freien Bindungsstellen mit Blockierungspuffer, danach 3x waschen
3. Auftragen der Proben und Standardreihe mit rmIL-6 (Peprotech, 100 g/ml):
2000 pg/ml - 31,25 pg/ml, 2h bei RT, danach 3x waschen
4. Detektionsantikörper mIL-6 (BD Pharmingen), biotinyliert 1:500 in Blockierungspuffer mischen und auftragen, 1 h bei RT, danach 4x waschen
5. Streptavidin-POD mit Blockierungspuffer 1:1000 mischen und auftragen, 30 min bei RT, danach 3x waschen
6. 100 µl TMB für Farbreaktion auftragen, 5-15 min. im Dunkeln
7. Stoppen der Farbreaktion mit 50 µl 1M H₂SO₄, Absorptionsmessung bei 450 nm.

2.3 Infektion von Mäusen mit dem Meningitis-Erreger *S. pneumoniae*

Adulte männliche WT-Mäuse (8-12 Wochen) mit C57Bl/6-Hintergrund wurden herangezogen. Alle hier beschriebenen Experimente an Mäusen befanden sich unter Aufsicht von Dr. O. Hoffmann, Charité, und im Einverständnis mit der zuständigen Tierschutzbeauftragten der Charité. Ein Tierversuchsantrag liegt den Behörden vor und wurde genehmigt. Um eine bakterielle Meningitis auszulösen, wurden sechs Tiere für 24 h und vier Tiere für 6 h mit dem Bakterium *S. pneumoniae*, D39 Stamm (bekapselt), intrathekal infiziert. Die Bakterienlast betrug 10⁵ cfu in 40 µl PBS. Zwei Tiere erhielten 40 µl PBS ohne Bakterien, diese dienten als gesunde Negativkontrollen. Allen Tieren wurde die Flüssigkeit intraspinal (i.s.) zwischen Lendenwirbel L2 und L3 injiziert, nachdem sie eine Anästhesie mit 100 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin erhielten. Nach 6 h wurde den 6h-infizierten Mäusen Liquor abgenommen. Dies geschah, indem subkutan mit einer Butterfly-Spritze in

den Subarachnoidalraum gestochen und 5-10 µl Liquor abgesaugt wurden. Dieses wurde auf einen Objektträger geträufelt und die Leukozytenzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Dasselbe Verfahren wurde bei den Negativkontrollen und den 24 h-infizierten Mäusen angewendet. Aus letzter Gruppe mit sechs Mäusen waren nach 24 h leider drei Mäuse verstorben. Nachdem Liquor abgenommen wurde, wurden die Tiere mit Natriumthiopental (100 mg/kg) sakrifiziert. Die Gehirne wurden herauspräpariert und sofort in Cryo-Eppendorfgefäßen in flüssigem N₂ schockgefroren.

2.3.1 Proteinextraktion aus Organen

Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, damit Proteine nicht denaturierten. Die Gehirne aus dem Versuch 3.1 werden auf Eis in ihren Eppendorfgefäßen leicht angetaut und mit einem Plastik-Pistill zerdrückt. Es wurde jeweils 750 µl eiskalter Lyse-puffer inkl. eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugegeben und für 5 min. mit einem Glasstab im Eppendorfgefäß gerührt.

2.4 Astrozyten- und Mikrogliapräparation aus der neonatalen WT-, NOD2^{-/-}-und TLR2/4^{-/-}-Maus

Mittlere Zellkulturflaschen (75 cm²) wurden für die Zellaussaat mit 10 ml Poly-L-Lysin (Biochrom 5 mg; 1:20 verdünnt in PBS) für ca. 2 Stunden beschichtet und anschliessend 3x mit PBS (PAA) gespült. Die Flaschen trockneten dann bei RT unter sterilen Bedingungen. Der nachfolgende Tierversuch wurde in der AG von Prof. Dr. Schumann ausgeführt und unterliegt der behördlichen Registrierungsnummer T0213/10. Die Tiere wurden vor dem Versuch in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM, Charité) gehalten.

Ein Wurf (5-6) neugeborener C57/Bl6-Mäuse (postnatal Tag p0-p5) wurde durch Abtrennen des Kopfes getötet. Die Köpfe wurden in kalter HBSS-Pufferlösung (Hank's buffered Saline Solution, PAA) ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ aufbewahrt. Alle weiteren Schritte erfolgten steril unter der Laminar Air Flow Bank der Zellkultur. Unter dem Binokular wurde die Haut des Schädels vom Kopf entfernt, die Schädeldecke aufgebrochen und mit einer Pinzette das Gehirn herauspräpariert. Die Cortices wurden abgetrennt, der Hippocampus und Bulbus olfactorius entfernt und verworfen. Die Meningen wurden von den Cortices abgezogen. Die Cortexhälften wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit HBSS-Pufferlösung überführt. Die HBSS-Pufferlösung wurde abgegossen

und zum Rest 2,5 ml 2,5% Trypsin zugegeben und für ca. 20 min. bei 37°C inkubiert, um Zellen aus ihrem Gewebeverband herauszulösen. Danach wurde das Trypsin mit 2,5 ml FCS (GIBCO) neutralisiert. Zu den ca. 5 ml Volumen wurden 100 µl DNase (1 mg/ml) zugegeben und die Zellen vorsichtig durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Der gesamte Inhalt des 15 ml Falcon-Röhrchens wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.200 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem completeDMEM (PAA) resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt mittels gleichzeitiger Verwendung eines auf das Röhrchen aufgesetzten 40-70 µm Zellsiebs (BD), um Astrozyten und Mikroglia durchzulassen und größere Zellen und Klümpchen aufzufangen und zu verwerfen. Um die Zellen gleichmäßig auf die Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen zu verteilen, wurde zum Filtrat (10 ml) ca. 26 ml cDMEM gegeben, gut resuspendiert und jeweils 12 ml pro Flasche eingefüllt. Das entspricht der Menge von 2 Gehirnen pro Kulturflasche. Am Folgetag wurde ein vollständiger Mediumwechsel mit cDMEM durchgeführt. Danach wurde die gemischte Zellkultur ca. 10-14 Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ stehen gelassen. Dieses Protokoll wurde nach McCarthy und de Vellis (1980) durchgeführt [197].

2.4.1 Abschütteln von Mikrogliazellen und Erstellen einer Monokultur

Nach ca. 10 bis 14 Tagen können Mikrogliazellen abgeschüttelt werden. Diese schwimmen auf dem adhären Astrozyten-Zellrasen. Dafür wurden die Zellkulturflaschen auf einem Schüttler für Mikrotiterplatten und Zellkulturflaschen fixiert und für 1,5 h bei RT und 230 rpm geschüttelt. Durch diese Technik erhält man eine zu 98 % reine Mikrogliakultur. Anschließend wurde das komplette Medium aller Flaschen in einem frischen Falcon-Röhrchen gesammelt. Der verbleibende Astrozyten-Zellrasen in den Flaschen wurde mit frischem Medium beschichtet und zurück in den Inkubator gestellt.

Nach Abzentrifugieren bei 1100 rpm, 5 min. und RT wurde der Überstand verworfen und das Mikroglia-Pellet in frischem cRPMI-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und je 1×10^5 Zellen je Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Erst am nächsten Tag wurde stimuliert. Nach weiteren 3-5 Tagen konnten die Astrozyten geerntet werden, indem sie mit 2,5 % Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst wurden. Nach Zugabe von cDMEM-Medium inkl. FCS wurden sie bei 1100 rpm für 5 min. in einem Falcon-

Röhrchen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Astrozyten-Pellet wurde in cDMEM-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und 4×10^4 Zellen je Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Erst am nächsten Tag wurde stimuliert.

2.4.2 Stimulation der Mikroglia- und Astrozytenzellen

Mikroglia und Astrozyten wurden nachfolgend gleichermaßen stimuliert. Beide Zelltypen wurden während den Stimulations-Versuchen in RPMI- oder DMEM-Medium ohne FCS und ohne Antibiotika inkubiert.

Medium wurde als Negativkontrolle mitgeführt. LPS O111:B4 aus *E. coli* (Invivogen) wurde in zwei Konzentrationen 1 und 100 ng/ml je Loch für 5-6 h zugegeben. Pam₂Cys wurde ebenfalls in den Konzentrationen 1 und 100 ng/ml je Loch für 5-6 h zugegeben. Der Überstand wurde immer bei -20°C zur nachfolgenden ELISA-Messung gelagert. Das Peptidoglykan MDP wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml für 18-19 h auf Zellen gegeben, die entweder mit LPS und Pam₂Cys vorstimuliert waren oder die nur in Medium wuchsen. ATP, in einer Konzentration von 3 mM, wurde auch als zweiter Stimulator für 1h auf den Zellen verwendet, die vorher mit LPS oder Pam₂Cys stimuliert wurden. Alle Überstände wurden bei -20°C für weitere ELISA-Messungen aufgehoben. Stimulierte Mikroglia und Astrozyten wurden in ihren 24-Loch Kulturplatten lysiert und das Lysat bei -80°C aufgehoben, um später zytoplasmatische Proteine (Caspase-1, proIL-1β) im Western Blot zu detektieren.

2.4.3 Nachweis von Mikroglia- und Astrozytenzellen mittels Immunfluoreszenz

Mikrogliazellen lassen sich morphologisch sehr gut von Astrozytenzellen unterscheiden. Sie schwimmen 10-14 Tage nach der Präparation als helle, sphärische Zellen im Medium, die Astrozytenzellen adhärieren als Monoschicht am Boden der Zellkulturflasche und besitzen sternenförmige Fortsätze.

Um beide Zelltypen immunologisch zu unterscheiden, wurde ein Nachweis mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurde in den Mikrogliazellen das Protein Iba1 mittels eines Antikörpers (Invitrogen, Carlsbad (USA)) detektiert, das wiederum nicht in Astrozyten vorkommt. Bei Astrozyten ist das Intermediärfilament-Protein GFAP (glial fibrillary acidic protein) markant, welches Mikrogliazellen nicht besitzen und wurde mit einem

GFAP-Antikörper von Chemikon (Temecula, USA) markiert. Die Immunfluoreszenz-Darstellung wurde von Sabrina Lehmann im Labor von Prof. Seija Lehnardt, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité, durchgeführt. Die Methode wird bei Lehmann *et al.* detailliert beschrieben [198]. An einem Olympus BX51-Mikroskop und einem Konfokal-Laserscanning-Mikroskop, LEICA TCS SL, wurde die Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen (Abb. 10).

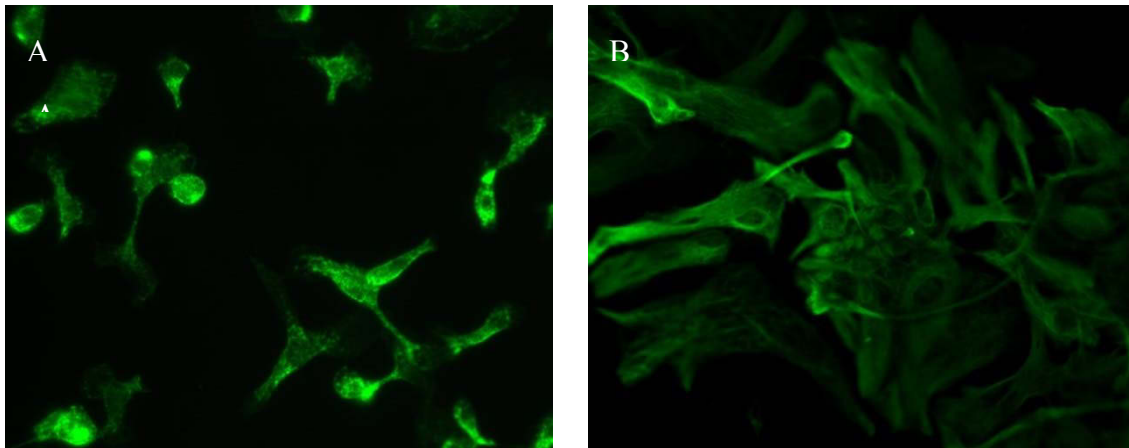


Abb. 10: Immunfluoreszenz von Mikroglia und Astrozyten.

Scannende, amöboide Mikroglia (A) wurden mit dem anti-Iba1-AK, Astrozyten (B) mit anti-GFAP-AK inkubiert.

2.5 Stimations-Assay von Zelllinien

Das Medium wurde abgesaugt und die Löcher 1x mit PBS gespült. Bakterielle Liganden (LPS, Pam₂Cys, MDP, iE-DAP) wurden in EMEM ohne FCS verdünnt, sodass eine Konzentration von 1 ng/ml bis 10.000 ng/ml entstand. LPS aus *E. coli* O111:B4 (Sigma), sowie LPS_{re595} (Sigma) und Pam₂Cys (Sigma) wurden in den Dosis-Wirkungsversuchen in einer Konzentration von 1 ng/ml bis 100 ng/ml eingesetzt und die Minimalstrukturen des Peptidoglykans, MDP (Invivogen) und iE-DAP (Invivogen), in einer Konzentration von 100 ng/ml bis 10.000 ng/ml. LPS O111:B4 stammt aus *E. coli* und besteht aus LipidA, dem Kern-Polysaccharid sowie der O-Antigen Oligosaccharidkette. Somit besteht Serotypen-Spezifität durch das O-Antigen. Die Bezeichnung O111:B4 ist eine immunologische Klassifizierung, um zu definieren, welcher Antikörper welches Antigen erkennt. LPS_{re595} (Sigma) ist eine genetische Variante („rauher Stamm“) des ursprünglichen Lipopolysaccharids aus *S. minnesota*. Bei dieser Mutante fehlt die hydrophile O-Antigen Oli-

gosaccharidkette und die Kern-Polysaccharidkette ist stark verkürzt. LPS re595 besteht demnach nur aus LipidA und 2-Keto-3-deoxyoktonat (KDO).

Jeweils 100 µl Medium inklusive Ligand wurden pro Loch zu den Zellen gegeben und 24 h ÜN inkubiert. LPS und Pam₂Cys wurden entweder allein zu 100 µl pro Loch inkubiert oder in Kombination mit MDP oder iE-DAP, dann zu jeweils 50 µl pro Well, so dass ein Endvolumen von 100 µl pro Well vorlag. Wenn ein 5 h-Priming vorgenommen werden sollte, wurden 100 µl je Well pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert, bis die Zytokin-Messung mittels ELISA durchgeführt wurde.

Tab. 1: Liganden für in vitro-Stimulation

Stimulans auf Zellkultur	Menge	Dauer (h)	Ziel
LPS	1 bis 100 ng/ml	4-6 h	Priming, TLR-Stim.
Pam ₂ Cys	1 bis 100 ng/ml	4-6 h	Priming, TLR-Stim.
MDP	1000 bis 10.000 ng/ml	18-20 h (ÜN)	Nod-Stim.
iE-DAP	1000 bis 10.000 ng/ml	18-20 h (ÜN)	Nod-Stim.
ATP	1 – 3 mM	30 min. – 1 h	Nod-Stim.

2.6 Kultivierung von Zelllinien

RAW 264.7 (Murine Peritonealmakrophagen Zelllinie)

Die Zellen wurden in complete RPMI 1640 Medium (10% FCS (Biochrom AG), 2 mM Glutamine, 1 mM Natrium-Pyruvat, ohne Pen/Strep (PAA)) in mittleren Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 2 Tage wurden die Zellen 1: 20 gesplittet, wenn sie bis zu 80 % konfluent waren. Das Medium wurde komplett abgesaugt, einmal mit 1x PBS gespült, und 10 ml frisches Medium in die Kulturflasche gegeben. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgeschabt und 1 ml der (1:20) Zellsuspension in eine frische Kulturflasche incl. 20 ml frischem RPMI-Medium überführt und resuspendiert. Die Flasche wurde bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator aufbewahrt.

THP1 (humane monozytäre Zelllinie)

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Medium (10 % FCS, 2 mM Glutamine, 1 mM Natrium-Pyruvat, ohne Pen/Strep) verwendet. Die Zellen wurden als Suspensionszellen in stehenden Kulturflaschen aufbewahrt. Zum Splitten wurde die gesamte Zellsuspension alle 2 bis 3 Tage in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.000 rpm ca. 5 min. abzentrifugiert. Das alte Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung wurde durchgeführt und ca. $2-8 \times 10^5$ Zellen pro ml wurden in eine neue Kulturflasche überführt und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Die Zellen wurden zu Stimulationsversuchen zu 3×10^5 Zellen pro Well in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und ca. 72 h mit 10 µM Vitamin D3 (1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3, 1:1000, Sigma) inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen.

U-87MG (humane Astrozytoma-Zelllinie)

Die U-87-Zellen (ECACC, UK) wurden in komplettem EMEM (Eagle's modified essential medium, (PAA) 10 % FCS (Biochrom AG), 1 % Natriumpyruvat, 1 % Non-essential amino acids, 40 U/ml Pen/Strep, 1 % L-Glutamin (PAA)) kultiviert. Die Stammkultur wurde 1x wöchentlich passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, 1x mit PBS gewaschen und die Zellen in 3 ml Trypsin/EDTA für 5 min. inkubiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in einem Falcon-Röhrchen bei 1000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in einer mittleren Zellkulturflasche in 20 ml complete EMEM im Verhältnis 1:3 ausgesät. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät (Greiner). Die Zellen wuchsen über Nacht an und adhärten. Die Stimulation erfolgte zwei Tage später an subkonfluenten Kulturen.

BV-2 (murine Mikroglia-Zelllinie)

Die Erstbeschreibung dieser Zelllinie geht auf Blasi E *et al.* (1989) zurück. Diese Zelllinie wurde in cDMEM (Dulbecco's modified essential medium (PAA), 10 % FCS (Biochrom AG), 1 % Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, ohne Pen/Strep (PAA)) kultiviert und zwei Mal wöchentlich 1:20 gesplittet. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit

sterilem PBS gespült und 10 ml frisches Medium zugegeben. Mit dem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt und 1ml Zellsuspension in 20 ml frischem Medium in einer neuen mittleren Zellkulturflasche resuspendiert. Es wurden 3×10^5 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät.

2.7 Präparation von primären Peritonealmakrophagen aus WT-und NOD2^{-/-}-Mäusen

Drei Monate alten (adulten) Mäusen mit C57Bl/6-Hintergrund wurde intraperitoneal Thioglycolat gespritzt. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die primären Peritonealmakrophagen unter Narkose entnommen. Vor dem Aussäen in Zellkulturplatten wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt, um eventuell verbleibende Erythrozyten aus der Makrophagen-Lösung zu entfernen. Dazu wurden die Makrophagen bei 1.100 rpm für 5 min. im 50 ml Falcon-Röhrchen herunterzentrifugiert, in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und 10 ml Aqua dest. hinzugegeben (Waschschritt). Danach wurde ins Falcon-Gefäß 40 ml RPMI-Medium hinzugegeben, nochmals rauf-und runterpipettiert und dann 5 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium resuspendiert und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Getrennt nach Geschlecht und genetischem Hintergrund wurden 5×10^5 Zellen pro Well in einer 24-Well Platte wurden kultiviert (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht über die primären murinen Peritonealmakrophagen
genetischer Hintergrund, Anzahl und Geschlecht der verwendeten Tiere.

Hintergrund	Anzahl	Geschlecht
WT C57Bl/6	3	männlich
	3	weiblich
TLR2/4 ^{-/-} C57Bl/6	3	männlich
	3	weiblich
Nod2 ^{-/-} C57Bl/6	3	männlich
	3	weiblich

Nach drei Tagen und einem Mediumwechsel nach 24 h, wurden die primären Peritonealmakrophagen mit den bakteriellen Liganden LPS (10 ng/ml und 100 ng/ml), Pam₂Cys (100 ng/ml) und MDP (10.000 ng/ml) bzw. ATP (3 mM) für 24 h stimuliert und ein mL-1β-ELISA durchgeführt.

2.8 Zelllyse und SDS-PAGE

Humane U-87MG-Astrozytomazellen (ECACC, UK) wurden mit 1×10^5 Zellen pro Well in eine 12-Well Platte ausgesät. Nach 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden sie je nach Schema in cEMEM ohne FCS und jeweiligem bakteriellem Liganden für weitere 24 h stimuliert. Danach wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 200 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM NaO₄V, Aqua dest.) inkl. 20 µl Protease-Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma) 15 min. auf Eis inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Die lysierten Zellen wurden in ein Eppendorf-Gefäß (je Well ein Gefäß) überführt und nochmals 20 min. auf Eis inkubiert. Dann erst wurden die Eppendorf-Gefäße bei 4°C und 13.000 rpm 20 min. zentrifugiert. Der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C aufgehoben bis zum weiteren Gebrauch. Die Pellets bestehend aus Zelltrümmern und DNA wurden verworfen.

Ein SDS-Gel wurde kurz vor der Verwendung gegossen, bestehend aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 16 %-igen Trenngel (s. Pipettierschema, für je 2 Gele).

Tab. 3: Pipettierschema für das Gießen von SDS-PAGE Gelen

Chemikalien	4 % Sammelgel (12 ml, für 2 Gele á 13 cm x 18 cm)	16 % Trenngel
H ₂ O	7,54 ml	9,9 ml
Trennpuffer, pH 8,8	-	7,5 ml
Sammelpuffer, pH 6,8	1,26 ml	-
40% Acrylamid	1 ml	12 ml
10 x SDS	100 µl	300 µl
10% APS	100 µl	300 µl
Temed	10 µl	12 µl

Diese Gele, die sich zwischen zwei Glasplatten befanden, wurden in die Halterung einer vertikalen Elektrophoresekammer geklemmt und so mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt, dass der untere Teil der Glasplatten in Puffer stand und die Gele von oben auch mit Puffer bedeckt waren (Semi-Dry-Verfahren). Die die zytoplasmatischen Proteine enthaltenden Überstände der stimulierten Zellen wurden mit 4 x Laufpuffer (Lämmli) versetzt und 7 min. bei 95°C denaturiert. Durch das SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung, Disulfid-Brücken werden gespalten und durch die Denaturierung wird die Proteinfaltung aufgehoben. Die Proben wurden stets zu 50 µl Gesamtvolumen je Geltasche aufgetragen.

und die Marker (SeeBlue Invitrogen Pre-Stained LC5925, Santa Cruz sc-2035) zu 8 μ l. Das Gel wurde zuerst bei 80 V laufen gelassen, bis die Laufront im Sammelgel das Trenngel erreicht hat (ca. 20 min). Dann wurde auf 120 V erhöht, für ca. 1,5 h.

Das Gel wurde daraufhin aus den Glasplatten in eine Schale mit Kathodenpuffer transferiert, wo es 15 min. inkubierte. Währenddessen wurde eine ca. 8x11 cm große PVDF-Membran (Millipore) vorbereitet: sie wurde für 15 sek. in 100 % Methanol geschwenkt, dann für 2 min. in Aqua dest. gelegt und für mindestens 5 min. im Anodenpuffer II inkubiert. Außerdem wurde Filterpapier, das während des Semi-dry-Blots Gel und Membran feucht hält, im Puffer inkubiert: 1 x Filterpapier in Anodenpuffer II, 2 x Filterpapier in Anodenpuffer I und 3 x Filterpapier in Kathodenpuffer. Nun erfolgte der Aufbau für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran. Zwischen zwei schwere Schieferplatten kamen von oben (Kathode) nach unten (Anode): 3 x Filterpapier Kathodenpuffer, Gel, Membran, 1 x Filterpapier Anodenpuffer II, 2 x Filterpapier Anodenpuffer I. Es wurde die Spannung 80 mA angelegt, diese fiel über Nacht auf 30mA. Am nächsten Morgen wurde die Membran vorsichtig freigelegt und mit einer Pinzette in eine Schale für weitere Inkubationsschritte des Western Blots gelegt.

2.9 Western Blot

Um die zytoplasmatischen Proteine proCaspase-1 bei 45 kDa und aktivierte Caspase-1 bei 10 kDa zu detektieren, wurde die Membran für 1h bei RT in 5 % Milcheiweiß-Lösung (Roth) blockiert. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit PBST-Lösung (1 x PBS-Lösung + 0,05 % Tween-20) wurde die Membran mit dem monoklonalen Primärantikörper ICE/Caspase-1 (1 μ g/ml) in einer Verdünnung von 1:500 für 2 h inkubiert (rabbit IgG, sc-515 human, sc-514 mouse, Santa Cruz Biotechnologies). Dieser Antikörper detektiert aktivierte Caspase-1 bei ca. 10 kDa und pro-Caspase-1 bei ca. 45 kDa (Tab. 4).

Für die Detektion des ersten AK wurde der zweite HRP-konjugierte goat-anti rabbit (sc-2030, Santa Cruz) Antikörper 1:5000 1 h verwendet.

Für die Detektion von humanem proIL-1 β (31 kDa) und reifem IL-1 β (17 kDa) wurde ein monoklonaler Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (rabbit IgG, #2022, Cell Signaling). Nach 3-maligem Waschen mit PBST-Puffer wurde ein zweiter HRP-konjugierter goat-anti-rabbit Antikörper 1:10.000 eingesetzt (sc-2030, Santa Cruz).

Das murine proIL-1 β wurde mit einem biotinylierten Antikörper (goat IgG, BAF401, R&D Systems) 1:250 für 2 h inkubiert, danach 3 x mit PBST-Puffer gewaschen und mit einem zweiten HRP-konjugierten polyklonalen donkey-anti goat Antikörper (sc-2033, Santa Cruz) 1:5000 für 1 h inkubiert. Nach anschließendem 3-maligen Waschgang mit PBST-Puffer und 1 x Waschen mit PBS wurde die Membran für 5 min. in Luminol-Lösung des ECL-Kits (Pierce) inkubiert, um die membrangebundene Peroxidase zu aktivieren. In Klar-sichtfolie eingewickelt, wurde auf die Membran in der Dunkelkammer des Instituts in einer lichtdichten Fotokassette eine unbelichtete Fotofolie gelegt. Nach 2 min. oder entsprechend mehr Zeit, wurde die Folie entnommen, zuerst 1 min. in Entwicklerlösung (Agfa) geschwenkt, dann kurz in Wasser neutralisiert und dann 1 min. in Fixierlösung (Agfa) gebadet. Anschliessend wurde die Folie luftgetrocknet. Dort, wo der HRP-gekoppelte Zweitantikörper an den Primärantikörper binden konnte, wurden Banden sichtbar und sichtbare Banden analysiert.

Tab. 4: Primär- und Sekundär-Antikörper im Western Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Detektion	Sekundärantikörper
Human Caspase-1, rabbitIgG	1:500	10 und 45 kDa	Goat anti-rabbit-HRP
Mouse Caspase-1, rabbitIgG	1:500	10 und 45 kDa	Goat anti-rabbit-HRP
Human IL-1 β , rabbit IgG	1:1000	17 und 34 kDa	Goat anti-rabbit-HRP
Mouse IL-1 β , goat IgG	1:250	17 und 34 kDa	Donkey anti-goat-HRP
Human/mouse ASC, mouse IgG	1:2000	24 kDa	Donkey anti-mouse-HRP
Human/mouse β -Actin, mouse IgG	1:1000	43 kDa	Goat anti-mouse-HRP

Um den Primär- und Sekundärantikörper von der Membran zu waschen, wurde ein Stripping-Puffer eingesetzt (Tab. 5). Dieser löste die Bindung des Primärantikörpers vom membrangebundenen Protein und im Folgeschritt konnte die Membran ein weiteres Mal mit einem anderen Primär- und Sekundärantikörper nach unten genannter Anleitung inkubiert werden. Dazu wurde die Membran 2 x für 1 h in der Stripping-Lösung inkubiert. Nach jeweils 1h wurde die Membran in Waschpuffer (1 x PBS+ 0,05 % Tween) 3 x für 5 min. gewaschen. Danach wurde 5 %-iges Magermilchpulver in PBS-T gelöst und die

Membran 1 h inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS-T folgte der nächste Primärantikörper für 2 h.

Tab. 5: Stripping-Puffer für Western Blot

Glycin	200mM	1,5 g
Tween-20	1%	1 ml
SDS	0,1%	0,1 g
Ad	100 ml, pH 2,2	

2.10 Inkubation der murinen Peritonealmakrophagen-Zelllinie RAW264.7 mit 17 β -Östradiol

RAW 264.7-Zellen der Peritonealmakrophagen-Zelllinie wurden in einer 75 cm² Kulturflasche kultiviert. Nach einer Passage von 1:20 wurde dem cRPMI-Medium 100 pM 17 β -Östradiol (Stock: 20 μ g/ml, Sigma) zugesetzt. In einer weiteren Zellkulturflasche gleicher Größe und Zellanzahl wurde dem RPMI-Medium 1 nM 17 β -Östradiol zugesetzt. Nach 3 Tagen bildeten die Zellen eine konfluente Monoschicht und wurden für nachfolgende Versuche verwendet.

2.10.1 RNA Interferenz mittels Elektroporation

Das Prinzip der RNA Interferenz besteht darin, dass vordesignte, kurze Oligonukleotidsequenzen (siRNA=short interfering RNA, ca. 21 Nukleotide lang) an eine Gensequenz der DNA hybridisieren und es der DNA-Polymerase unmöglich machen, diesen Teil der DNA abzulesen. Somit wird die Transkription in mRNA verhindert und damit auch die Translation zum Protein.

Dazu werden siRNA Sequenzen auf ein bestimmtes Gen vordesigniert, das heißt die Basenabfolge des zu inhibierenden Gens ist bekannt und 21 Nukleotide, die an diese Sequenz hybridisieren sollen, werden aneinander gereiht. Das Medium konfluenter Zellen der RAW 264.7-Zelllinie, die in zwei verschiedenen Konzentrationen von 17 β -Östradiol wuchsen, wurde abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml frischem cRPMI-Medium abgeschabt und in ein verschraubbares Röhrchen überführt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen pro ml gezählt und so in ein 15 ml Falcon-Fläschchen abgefüllt, dass 2x10⁶ Zellen vorlagen. Je nachdem, wie viele Gene ausgeschaltet und Positiv-

und Negativkontrollen mitgeführt wurden, mussten dementsprechend viele Röhrchen mit 2×10^6 Zellen befüllt werden.

Tab. 6: Schema der Transfektionsansätze für siRNA

Gen	Konz. (µg)	siRNA-ID (Ambion)	Funktion
mNOD2a	2	s110941	Nod2-silencing
mCasp-1	2	s63370	Casp-1-silencing
mGAPDH	2	s234321	Positiv-Kontrolle; Housekeeping-Gen (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
mASC	2	s83918	Teil des Inflammasoms
MOCK	2 µl	Medium, incl Transfekt.reagenz	Negativ-Kontrolle

Die Röhrchen wurden bei 1000 rpm für 5 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet blieb übrig. Es wurde je Ansatz 100 µl des Transfektionsreagenz „Solution V“ aus dem AMAXA-Kit zugegeben (speziell für RAW-Zellen) und die Zellen darin resuspendiert. Hinzu kamen 2 µg der jeweiligen siRNA-Sequenz (Ambion). Die 5 nmolare siRNA-Sequenz wurde vorher in 500 µl sterilem Aqua dest. gelöst, so dass eine 10 µM siRNA-Lösung vorlag. Mittels einer dünnen Pasteur-Pipette wurde die Lösung in eine sterile Glas-Küvette überführt. Die Glas-Küvette wurde in das Elektroporationsgerät von AMAXA (Nucleofector™) gestellt und der Elektroporationsvorgang mit dem Programm D-032 gestartet. Dabei wurde die Zellmembran der RAW-Zellen kurzfristig durch elektrischen Strom geöffnet, die siRNA konnte in die Zelle gelangen und somit an ihre Ziel-mRNA im Cytosol hybridisieren. Die Küvette wurde wieder steril geöffnet und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml vorgewärmtem (37°C) RPMI-Medium überführt. Am Ende der siRNA-Transfektion wurden die Zellen in eine 24-Well Platte zu jeweils 2×10^5 Zellen pro Well ausgesät und für 48 h bei 37°C inkubiert. So ergaben sich für jeden Ansatz 6 Wells mit siRNA-transfizierten Zellen.

2.10.2 TLR4- und NOD2-Stimulation der siRNA-transfizierten RAW264.7 Zellen mit bakteriellen Liganden

Nach der 48-stündigen Inkubation wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und 1 x mit PBS gewaschen. FCS-freies RPMI-Medium wurde mit dem jeweiligen bakteriellen Liganden versetzt; LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml und MDP in einer Konzentration

von 10 µg/ml. Den Zellen eines siRNA-Ansatzes wurde entweder nur LPS, nur MDP oder eine Kombination aus beiden Liganden zugeführt, insgesamt 100 µl pro Well. Zellen, die nur LPS erhielten, wurden für 6h inkubiert, danach wurde das Medium abgenommen und bei -20°C aufgehoben. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und weitere 18 h in FCS-freiem Medium inkubiert. Zellen, die nur MDP erhielten, wurden für 18 h inkubiert, danach wurde das Medium abgenommen und bei -20°C aufgehoben.

Zellen die eine Kombination aus LPS und MDP erhielten, wurden zuerst für 6 h in LPS inkubiert, danach wurde das LPS-haltige Medium abgenommen und bei -20°C aufgehoben. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit MDP-haltigem Medium für 18 h inkubiert. Nach insgesamt 24 h wurde das Medium abgenommen und bei -20°C aufgehoben.

2.10.3 RNA-Extraktion aus siRNA-transfizierten RAW264.7 Zellen

Die Gesamt-RNA aus den RAW264.7 Zellen wurde mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit for total RNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert. Das Medium aus einem Well mit 2×10^5 Zellen wurde abgesaugt und 200 ml PBS zugegeben und die Zellen resuspendiert. Es wurde 400 ml Lysepuffer zugefügt und 15 s stark gemischt. Ein im Kit enthaltener Filteraufsatz wurde auf ein frisches Eppendorfgefäß gesetzt, die Zellsuspension in das Filterreservoir pipettiert und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. 90 µl DNase-Inkubationspuffer und 10 µl DNase I wurden vermischt und in das Filterreservoir pipettiert. Eine Inkubationsphase von 15 min. bei RT wurde eingehalten. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer I wurde für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zwei weitere Waschschrte folgten, dann konnte der Filteraufsatz auf ein frisches, steriles Eppendorfgefäß aufgesetzt werden. Die RNA wurde mit Hilfe von 50 µl Elutionspuffer und einem Zentrifugationsschritt für 2 min. bei 8000 x g aus dem Filter abgelöst und im Eppendorfgefäß gesammelt. Bis die RT-PCR vorgenommen wurde, wurde die isolierte RNA bei -20°C aufgehoben.

2.10.4 Reverse-Transkription (RT)

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte nach Herstellerangaben (Omniscript for two-tube RT-PCR, Qiagen) des Kits. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis (4°C). Ein Mastermix wurde wie folgt angesetzt:

Tab. 7: Master-Mix Protokoll für RT

Komponenten	Vol./Reaktion	Endkonz.
10 x RT-Puffer	2 µl	1 x
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo-dT Primer (10 µM)	2 µl	1 µM
RNase inhibitor (10 Units/µl)	1 µl	10 Units
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 Units
RNase-freies Wasser	variabel	-
Template RNA	50 ng – 2 µg	2 µg
→ Endvolumen 20 µl		

Jede Template-(Muster-) RNA wurde separat in ein PCR-Gefäß mit dem entsprechenden Volumen des Mastermixes pipettiert. Es wurde eine RT für folgende Ansätze gemacht: mNod2, mGAPDH, Aqua dest., controlSiRNA. Nach sanftem Mixen der Komponenten und vorsichtigem zentrifugieren, um Restflüssigkeit an den Gefäßwänden zu sammeln, wurden die Ansätze für 1 h bei 60°C inkubiert, um cDNA zu erhalten.

2.10.5 Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA

Die Primer (BioTeZ GmbH) für die PCR wurden so verdünnt, dass sie in einer Konzentration von 100 µM vorlagen. Ein Mastermix wurde angesetzt, um für jeden Ansatz 50 µl Endvolumen zu erhalten. Zu jedem Ansatz wurden 5 µl der entsprechenden cDNA hinzu pipettiert.

Tab. 8: Pipettierschema für PCR

Komponente	Menge
cDNA	5 µl
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP (2,5 mM)	4 µl
Primer forw (10 µM)	2,5 µl
Primer rev (10 µM)	2,5 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	29,25 µl
→ Endvolumen 50 µl	

Die Ansätze wurden im Thermocycler mit folgendem Programm gestartet: Initialisierung und Denaturierung bei 95°C für 5 min. bzw. 40 s, Primerhybridisierung bei 58°C für 40 s, Elongation bei 72°C für 60 s, insgesamt 35 Zyklen. Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde ein 2 %-iges Agarose-Gel gegossen. Dafür wurde 1 g Agarose und 50 ml TE-Puffer gemischt, aufgeköcht und in der Gelkammer geliert. Vor dem Gelieren wurde GelRed (1:10.000) hinzugegeben, ein Farbstoff, der mit der DNA interkaliert und dafür verantwortlich ist, dass später im Schwarzlicht Banden zu sehen sind. Nach Auftragen der PCR-Produkte und des DNA-Standards wurde das Gel gestartet, indem eine Spannung von 120 V angelegt wurde.

2.10.6 Caspase-1 Aktivitäts-Assay

RAW264.7-Zellen wurden wie unter 2.10.1 mit siRNA transfiziert und wie unter 2.10.2 mit bakteriellen Liganden stimuliert. Vorher wurden die Zellen entweder für 24 h in 1 nM E2 inkubiert oder nicht. 5×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in kaltem Lysepuffer resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden sie wieder für 1 min. bei 10.000 x g abzentrifugiert. Im Überstand befindet sich der zytosolische Extrakt, der in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert wurde. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt. 200 µg Protein wurden in 50 µl Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden 50 µl 2 x Reaktionspuffer (enthält 10 mM DTT) und 5 µl 4 mM YVAD-pNA Substrat (Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-pNA (pNA=p-Nitroaniline)) aus dem Kit

(Abcam) hinzugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. In einem Mikropplattenreader wurde bei 405 nm die Umsetzung des Substrats gemessen. Wenn Casapse-1 in der Probe vorhanden ist, spaltet diese *p*NA vom YVAD ab, woraufhin der Farbumschlag erfolgt. Als Positivkontrolle wurde statt Probe rmCaspase-1 zugegeben. In der Negativkontrolle befand sich statt Probe Aqua dest.

2.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm GraphPad Prism 5 durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden bestimmt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde, wie jeweils vermerkt, mit dem dem two-tailed Student's T-test oder two-way ANOVA (analysis of variance)-Test überprüft, gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. Eine Gauss'sche Normalverteilung wurde angenommen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant erachtet, wenn * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. Der *p* (probability)-Wert ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die Daten wie beobachtet realisieren, falls in Wirklichkeit die Nullhypothese zutrifft. Je kleiner der Wert desto deutlicher spricht das beobachtete Ergebnis gegen die Nullhypothese. Eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit wird festgelegt (Signifikanzniveau α), die den Fehler 1. Art (Nullhypothese ablehnen) begrenzt. Das gewählte Niveau in dieser Arbeit beträgt $\alpha = 0.05$. Ist der *p*-Wert kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau, liegt statistische Signifikanz vor. Der two-way ANOVA-Test untersucht, wie ein Ergebnis von zwei Faktoren beeinflusst wird. In den ELISA-Versuchen dieser Arbeit sind die verschiedenen bakteriellen Liganden in Kombination die Faktoren, die Einfluss auf die Zytokin-Sekretion nehmen.

2.12 Material

2.12.1 Zellen, Zellkulturmedien und Kulturmediumzusätze

Alle Kulturmedien stammen von der Firma PAA Cell Culture Company, Cambridge (UK)

Zellen	Medium	Herkunft
Primäre Wildtyp Mikroglia und Astrozyten	RPMI1640, DMEM	C57Bl/6J-Maus, Charité
Primäre Nod2 ^{-/-} Mikroglia und Astrozyten	RPMI1640, DMEM	C57Bl/6J-Maus, Charité
Primäre TLR2/4 ^{-/-} Mikroglia und Astrozyten	RPMI1640, DMEM	C57Bl/6J-Maus, Charité
Primäre Wildtyp Peritonealmakrophagen	RPMI1640	C57Bl/6J-Maus, Charité
Primäre Nod2 ^{-/-} Peritonealmakrophagen	RPMI1640	C57Bl/6J-Maus, Charité
Humane U-87 MG Astrozytenzelllinie	EMEM	ECACC, Salisbury, (UK)
Humane BV-2 Mikrogliazelllinie	DMEM	Neurophysiologie, Charité Berlin
Humane THP1 Monozyten/Makrophagenzelllinie	RPMI1640	DSMZ, Braunschweig(D)
Murine RAW264.7 Makrophagenzelllinie	RPMI1640	DSMZ, Braunschweig(D)

Kulturmediumzusätze

PBS pH 7,4	PAA Cell Culture Company, Cambridge
HBSS	PAA Cell Culture Company, Cambridge
Minimalmedium	Komplettmedium ohne FCS
FCS	GIBCO Life Technologies (USA)

Natriumpyruvat	PAA Cell Culture Company, Cambridge
L-Glutamin GlutaMAX	GIBCO Life Technologies (USA)
Non-essential amino acids	PAA Cell Culture Company, Cambridge
Penicillin/Streptomycin	PAA Cell Culture Company, Cambridge
Vitamin D3 (1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
17 β -Östradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Poly-L-Lysin, 5 mg	Biochrom GmbH, Berlin (D)

2.12.2 Kits, bakterielle Liganden und Antikörper

Kits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Qiagen Omniscript RT-PCR	Qiagen, Hilden (D)
Cell Line Nucleofector Kit V, VCA-1003	Lonza AG, Köln (D)
Luminol ECL Detection Kit	Pierce, Rockford (USA)
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden (D)
Caspase-1 Colorimetric Assay	Abcam, Cambridge (UK)

Bakterielle Liganden

<i>S. pneumoniae</i> D39, bekapselt	Rockefeller Univ., New York (USA)
LPS O111:B4 (<i>E. coli</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
LPS re595 (<i>S. minnesota</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Pam ₂ CysSK ₄	EMC Microcollections, Tübingen (D)
MDP	Invivogen, Toulouse (F)
iE-DAP	Invivogen, Toulouse (F)

Antikörper

Anti human Caspase-1 p10, sc-515	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Anti mouse Caspase-1 p10, sc-514	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Anti human IL-1 β WB, #2022	Cell Signaling/NEB GmbH, Frankfurt a.M. (D)
Anti human IL-1 β monoclonal, BAF601	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Anti human IL-1 β biotinyliert,	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Anti mouse IL-1 β , biotinyliert, BAF401	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Anti mouse IL-1 β , monoclonal, MAB401	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Anti mouse IL-6, biotinyliert #30936	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti mouse IL-6, monoclonal #554400	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti mouse ASC, #04-147	Millipore, Temecula (USA)
Anti human/mouse β -Actin, sc-47778	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Anti mouse Iba1	Invitrogen, Life Technologies (USA)
Anti mouse GFAP	Chemikon, Temecula (USA)
Goat anti-rabbit-HRP, sc-2030	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Donkey anti-goat-HRP, sc-2033	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Donkey anti-rabbit-HRP, NA934	Amersham GE Healthcare, Freiburg (D)

2.12.3 siRNA-Ribonukleotide, Primer für PCR mit cDNA und Standards

siRNA-Ribonukleotide

Human Casp-1 silencer pre-designed siRNA	Ambion, Darmstadt (D)
Human ASC silencer pre-des. siRNA	Ambion, Darmstadt (D)
Human GAPDH silencer pre-des. siRNA	Ambion, Darmstadt (D)
Mouse Nod2 silencer pre-des. siRNA	Ambion, Darmstadt (D)

Primer für PCR mit cDNA

mNOD2 forw	5'-ATGTGCTCACAGGAAGAGTTC-3'	BioTeZ Berlin-Buch GmbH (D)
mNOD2 rev	5'-TCACAACAAGAGTCTGGCGT-3'	BioTeZ Berlin-Buch GmbH (D)
mGAPDH forw	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCG- TAT-3'	BioTeZ Berlin-Buch GmbH (D)
mGAPDH rev	5'-AGCCTTCTCCATGGTGAAGAC-3'	BioTeZ Berlin-Buch GmbH (D)

Standards

Humane Caspase-1, #1081-25-BV	BioCat GmbH, Heidelberg (D)
Murine Caspase-1, 10 kDa, #1181-25	BioVision, Mountain View (USA)
Murines IL-1 β , #401-ML	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Humanes IL-1 β	Cell Concepts GmbH, Umkirch (D)
Murines IL-6, #216-16	Peptotech, Rocky Hill (USA)
Proteinstandard, See Blue [®] Plus2	Invitrogen, Life Technologies (USA)
Proteinstandard, sc2035	Santa Cruz Molecular Weight Standard, Santa Cruz (USA)

2.12.4 Anästhetika, Präparationsbesteck und –bedarf und Puffer

2.12.5 Anästhetika

Ketamin	Delta Select, Pfullingen (D)
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen (D)
Natriumthiopental	Takeda Pharma GmbH, Berlin (D)

Präparationsbesteck und -bedarf

Präparierpinzette, spitz, gebogen	Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen (D)
Uhrmacherpinzette, Dumont, Nr. 5	Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen (D)
Präparierschere, spitz, gerade, 12,5 cm	Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen (D)
Hakenpinzette	Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen (D)
Skalpell	Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen (D)
Bresser Analyth, Stereomikroskop	Vegaoptics GmbH, Albstadt (D)

Puffer

Coating-Puffer	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,2
10 x SDS-Laufpuffer	30,2 g TrisBase, 188 g Glycin → ad 1000 ml Aq. dest., pH 8,3
1 x SDS- Laufpuffer	50 ml 10 x SDS-Laufpuffer, 5 ml 10 % SDS → ad 500 ml Aq. dest
4 x Probenpuffer, reduzierend	10 ml 1M Tris, pH 6,8, 3.1 g DTT, 0.2 g Bromphenolblau, 30 ml Glycerin
10 x PBS	160 g NaCl, 4 g KCl, 28.8 g Na ₂ HPO ₄ , 4.8 g KH ₂ PO ₄ , → ad 2 l Aq. dest.
Anodenpuffer I	0.3 M Tris, 10 % Methanol, pH 10.4
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 10 % Methanol, pH 10.4
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 1.5 g Glycin, 10 % Methanol, pH 9.4
PBST-Puffer	1 x PBS, 0,05 % Tween-20
Blockier-Puffer	1 x PBS, 5 % Magermilchpulver (Frisch zugesetzt) → WB 1 x PBS, 10 % FCS, 0,05 % Tween-20 → ELISA
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM NaO ₄ V, ad Aqua dest.

2.12.6 Chemikalien, Verbrauchsgegenstände, Laborgeräte, Software

Chemikalien

40 % Acrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
dNTPs	NEB GmbH, Frankfurt a.M. (D)
EDTA	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
EGTA	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Entwicklerlösung G150	Agfa Healthcare GmbH, Bonn (D)
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Fixierlösung G354	Agfa Healthcare GmbH, Bonn (D)
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
HRP	Peptotech, Rocky Hill (USA)
Magermilchpulver, 5 %	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
MgCl ₂	NEB GmbH, Frankfurt a.M. (D)
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
NaCl	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
NaF	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
NaO ₄ V	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Oxidized ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Streptavidin-POD 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
17β – Östradiol, 20 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Poly-L-Lysin	Biochrom GmbH, Berlin (D)

Material und Methoden

Protease Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
RNase Zap	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Substrat für Western Blot	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford (USA)
Seramun blau® slow (TMB)	Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee (D)
Taq-Polymerase	NEB GmbH, Frankfurt a.M. (D)
TBS	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Triton X-100	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Trypsin	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Tween-20	Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Verbrauchsgegenstände

Einweg Reaktionsgefäße 0,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Falcon-Tubes, 15 und 50 ml	Becton Dickinson (BD), Heidelberg (D)
Pipettenspitzen	100-1000µl Roth GmbH, Karlsruhe (D) 0,5-10 µl und 10-200 µl Sarstedt, Nümbrecht(D)
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Trasadingen (CH)
Zellsieb 40-70 µm	Becton Dickinson (BD), Heidelberg (D)
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturplatten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen (D)
Immobilon-P PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach (D)
Gel-Blotting Filterpapiere	Whatman GE Healthcare, Freiburg (D)

CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific, (USA)
ELISA Mikrotiterplatte	Nunc, Wiesbaden (D)
Glasgefäße	Schott/Duran, Wertheim/Main (D)

Laborgeräte

Satz Pipetten / Finnpietten	Eppendorf, Hamburg (D) / Thermo Scientific, (USA)
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences AG, Zizers (CH)
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz (CH)
Neubauer-Zählkammer	Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen (D)
Western Blot Transfer-Apparatur	H. Hölzel, Wörth/Hörlkofen (D)
Stromregler	GIBCO Life Technologies (USA)
Thermocycler	Biometra/Whatman, Göttingen (D)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (D)
Platten-und Flaschenschüttler <i>Rocky</i>	Biometra, Göttingen (D)
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg (D)
Nucleofector	Lonza AG, Köln (D)
ELISA-Reader Spectra Fluor Plus	Tecan, Crailsheim (D)
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Kelheim (D)
Laminar Air Flow Werkbank	Antair BSK, Heraeus Herasafe
CO ₂ Inkubator Heracell	Thermo Fisher Scientific, (USA)
(Inkubations-) Wasserbad	GFL, Burgwedel (D)
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen (D)

Software

Magellan Version 3	Tecan, Crailsheim (D)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
EndNote X7	Thomson Reuters, 2013

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei Mikroglia- und Astrozytenzellen des Gehirns eine zweistufige Stimulation durch Toll-like Rezeptoren und Nod-like Rezeptoren während eines bakteriellen Entzündungsprozesses nötig ist, um zu einer synergistischen IL-1 β -Ausschüttung zu führen. Dazu wurden in ersten Versuchen Mäuse mit Pneumokokken bzw. PBS infiziert, um zu eruieren, ob das Interleukin IL-1 β unter diesen Versuchsbedingungen im Gehirn ausgeschüttet wird. Desweiteren wurden in zwei Gehirn-Zelllinien mit Hilfe von bakteriellen, zum Teil synthetisch hergestellten Liganden von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien TLRs und NLRs stimuliert und somit NF- κ B und Caspase-1 aktiviert und Dosis-Wirkungskurven zur IL-1 β -Ausschüttung ermittelt. Daraufhin kamen kultivierte primäre murine Gliazellen aus WT- und Nod2- und TLR2/4-knock-out Mäusen zum Einsatz, um die synergistische IL-1 β -Ausschüttung unter Bedingungen zu untersuchen, die eher den biologischen Voraussetzungen entsprechen, als Zelllinien dies widerspiegeln könnten.

In RNAi-Versuchen mit Zelllinien sollte untersucht werden, wie sich die IL-1 β -Ausschüttung ändert, wenn ein knock-down eines essentiellen Gens stattfindet.

Um die Ergebnisse der Zelllinien-Versuche besser einordnen zu können, wurden Experimente mit primären Peritonealmakrophagen aus WT und Knock-out Mäusen durchgeführt.

3.1 Erhöhte IL-1 β -Freisetzung im Maus-Gehirn nach Pneumokokken-Infektion

Jeweils vier C57Bl/6 Mäusen wurde entweder 40 μ l PBS oder 40 μ l Pneumokokken-Suspension (cfu 1×10^5) intra-spinal injiziert und 24 h inkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) intra-peritoneal anästhesiert. Danach wurde den Mäusen Liquor subkutan aus dem Subarachnoidalraum entnommen (5-10 μ l), um die Anzahl der eingewanderten Leukozyten im Liquor zu bestimmen. Vor der Hirnentnahme wurden die Mäuse mittels 0,9 %-iger NaCl-Lösung perfundiert, um das Blut aus dem Körper und den Organen zu spülen. Dann wurde der Kopf abgetrennt und das Gehirn herauspräpariert und sofort in einem Cryo-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mäuse, denen in vivo für 24 h mit 1×10^5 cfu Pneumokokken infiziert wurden, zeigten im ELISA eine deutlich höhere IL-1 β -Ausschüttung, ca.

6.000 pg/ml, als Mäuse, denen PBS injiziert wurde (ca. 2000 pg/ml). Dieser Unterschied trägt eine hohe Signifikanz ($p < 0,05$), wie in in Abb. 11 gezeigt wird.

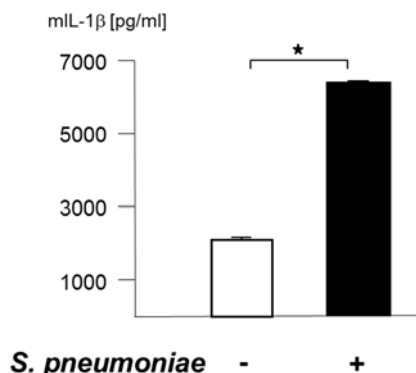


Abb. 11: Hirnhomogenat der Maus mit und ohne 24h Pneumokokken-Infektion.

Dargestellt sind mL-1β-Konzentrationen von 3 homogenisierten Gehirnen nach ELISA-Messung. Signifikanz der unterschiedlichen Konzentrationen wird durch einen Stern indiziert (* $p < 0,031$; two-tailed t-test)

In der nachstehenden Tabelle 9 wurden die Versuchstiere des Versuchs zusammengefasst. Sechs Mäuse wurden für 24 h mit dem Pneumokokkenstamm D39 (cfu 10^5) infiziert, wovon 3 Mäuse innerhalb von 24 h verstarben. Die Überstände des Hirnhomogenats wurden in einem ELISA auf das Zytokin mL-1β gemessen (Abb. 11).

Tab. 9: Versuchsschema zur Infektion von Mäusen mit *S. pneumoniae*, Stamm D39.

Das Experiment wurde mit 12 Mäusen durchgeführt. Von 6 Mäusen, die für 24h infiziert wurden, verstarben 3 Tiere. Von 4 Mäusen, die für 6h infiziert wurden, überlebten alle. Zur Kontrolle wurde 2 Mäusen PBS injiziert. Von allen Tieren wurde das Gehirn perfundiert, entnommen und gruppenweise das Hirnhomogenat für einen ELISA-Versuch und mL-1β-Messung aufbereitet.

Tier Nr.	Stamm	Gewicht	Geschl.	Versuchsbeginn	Inokulation	Versuchsdauer	Zellzahl / μ l
M1	C57Bl/6 (ChR)	Ca. 20 g	M	16.00 h – 17.00 h	40 μ l D39 10 ⁵ cfu	24 h	2048
M2							3754
M3							4437
M4						Gestorben zwischen 18 und 24 h	-
M5							-
M6							-
C1				Folgetag 8.30 h – 9.00 h	40 μ l PBS	6 h	21
C2							16
M7					40 μ l D39 10 ⁵ cfu		1365
M8							2389
M9							3328
M10							2219

Desweiteren wurde die Leukozytenzellzahl ermittelt. Dieser Zelltyp (u.a. periphere Makrophagen, Granulozyten) migriert während einer Infektion des Gehirns ins ZNS ein, um dort die zelluläre Immunantwort zu beginnen. Die PBS-injizierten Kontrolltiere (C1 und C2) wiesen eine geringere Leukozytenzahl im Liquor auf (im Durchschnitt 18,5 Zellen/ μ l) als die Tiere, die für 6h mit *S. pneumoniae* infiziert waren (M7-M10, im Durchschnitt 2325,25 Zellen/ μ l) und Tiere, die für 24 h mit *S. pneumoniae* infiziert waren (M1-M3, 3413 Zellen/ μ l). Die zelluläre Immunantwort der unspezifischen Abwehr setzt demzufolge im Gehirn sehr früh ein, mindestens 6 h nach Infektion. Dem muss eine Immunantwort vorausgehen, mit der Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten und vaskulären Endothelzellen als immunogene Zellen des Gehirns, die Zytokine und Chemokine exprimieren, um Leukozyten zum Ort der Infektion zu locken. TNF-alpha ist ein früh exprimiertes Zytokin, das 4 h nach Infektion mit einem Pathogen auftritt. Das Zytokin IL-1 β tritt eher spät, nach ca. 24 h auf.

3.2 Stimulation von Zelllinien mit Zellwandbestandteilen Gram-negativer Bakterien

Desweiteren wurde in einem Vorversuch untersucht, ob Zelllinien aus unserem Labor dazu in der Lage sind, nach Stimulation mit bakteriellen Liganden, IL-1 β zu produzieren. Dazu wurden RAW264.7 und THP1-Zellen verwendet, die im ersten Fall auf murinen Peritonealmakrophagen beruhen und im zweiten Fall auf humanen Monozyten. Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS oder MDP bzw, mesoDAP allein oder in Kombination mit beiden Liganden stimuliert. Aus den Ergebnissen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt und in weiteren Versuchen mit Primärzellen die Konzentrationen verwendet, die zu einer hohen IL-1 β -Ausschüttung führten. Bei Doppelstimulation von TLR4 und NOD2 (Abb. 12a) zeigte sich in beiden Zelllinien, dass diese Rezeptoren in synergistischer Weise in Bezug auf die IL-1 β -Ausschüttung kooperieren. Auch die kombinierte Stimulation von TLR4 und NOD1 (Abb. 12b) führt zu einer erhöhten IL-1 β -Sekretion.

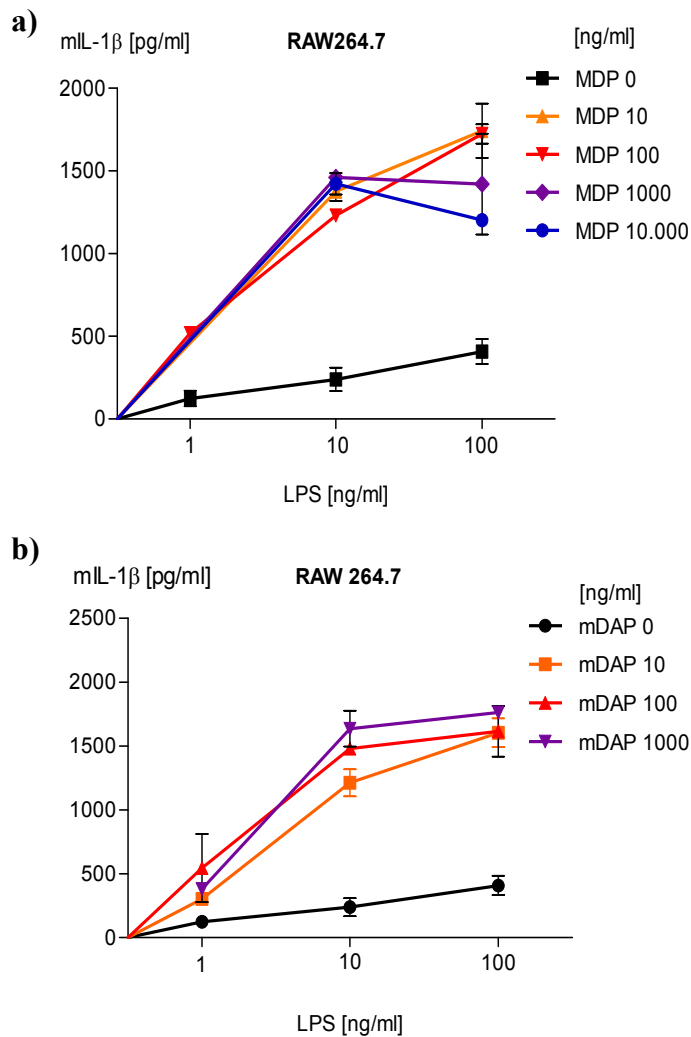


Abb. 12: IL-1 β -Konzentrationen von RAW264.7 Zellen

Die Zellen wurden 6h mit LPS re595 (1-100 ng/ml) vorinkubiert, danach für 18h mit verschiedenen Konzentrationen von MDP (a) bzw. mesoDAP (b) stimuliert. Die Überstände wurden nach 24h gewonnen und im ELISA die mL-1 β -Konzentration gemessen.

Außerdem wurde IL-1 β in hohem Maße ausgeschüttet (bis ca. 2000 pg/ml), wenn RAW-Zellen 6h mit LPS (100 ng/ml) vorstimuliert und dann 18h mit mesoDAP (1000 ng/ml) inkubiert wurden. Der TLR4-Rezeptor und der NOD1-Rezeptor scheinen in synergistischer Weise zusammenzuarbeiten. Im Western Blot wurden RAW-Zellen in Bezug auf die zytosomatische Caspase-1-Aktivierung untersucht, nachdem mit LPS und MDP stimuliert wurde. Die Zellen wurden dafür nach Ablauf der Stimulationszeit von insgesamt 24h lysiert und für den Western Blot aufbereitet (s. Material und Methoden). Der Caspase-1-Inhibitor YVAD-CHO wurde mitgeführt, um die Beteiligung von NOD2 als Caspase-1-

Aktivator durch MDP darzulegen (Abb. 13). Die Zellen wurden in 25 μ M YVAD-CHO für 2h bei 37°C vorinkubiert. Nach dem Spülen der Zellen wurde stimuliert.

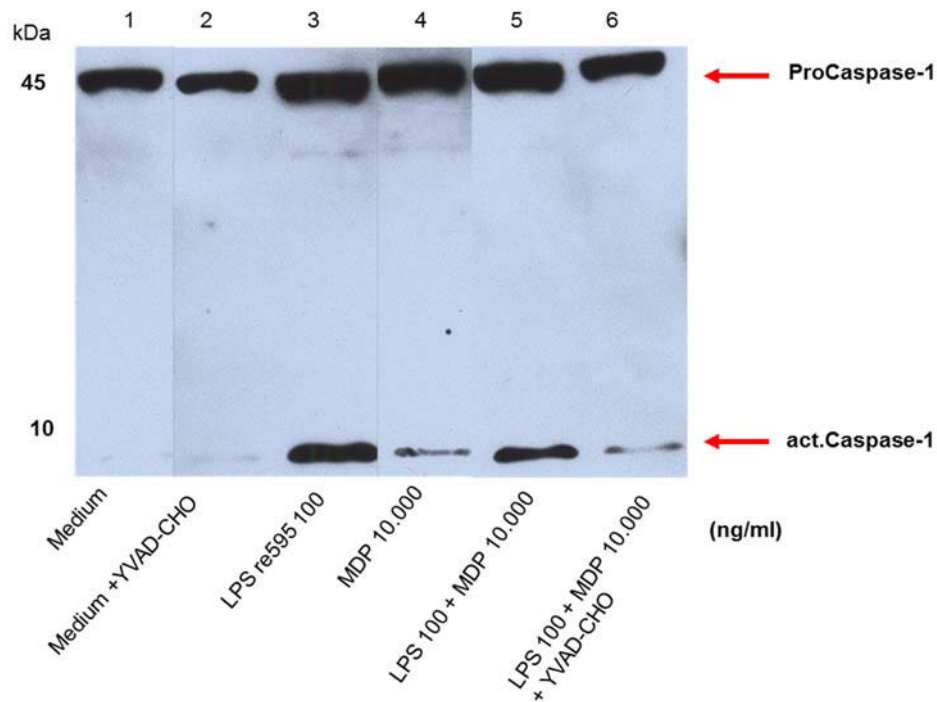


Abb. 13: Western Blot von RAW264.7-Zellen.

Es wurde stimuliert mit LPS re595 (6h-Priming) und MDP (18h) sowie dem Casp-1 Inhibitor YVAD-CHO (Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd). Es wurde ein anti-mouse Antikörper 1:500 eingesetzt (sc-514), der die Vorläufer-Form (p45) und aktivierte Caspase-1 (p10) detektiert. Der sekundäre AK (goat anti-rabbit, sc-2030) wurde im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Die Belichtungszeit des Films betrug 16 min.

ProCaspase-1 wird in RAW264.7 Zellen konstitutiv exprimiert, d.h. dieses Protein wird auch ohne Stimulation exprimiert. YVAD-CHO (Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd) als Caspase-1 Inhibitor hat weder Einfluss auf die Expression von ProCaspase-1 noch auf die Expression eines anderen Proteins (Spur 2). MDP scheint kein Caspase-1-Aktivator zu sein, nur in Kombination mit LPS (100 ng/ml) wird ProCaspase-1 zu aktiver Caspase-1 autolytisch geschnitten, wie in Spur 5 ersichtlich ist. Wird der Caspase-1-Inhibitor YVAD-CHO dazu gegeben, wird die Reifung von Pro-Caspase-1 zu aktiver Caspase-1 inhibiert (Spur 6). Die monozytäre Zelllinie THP1 muss zu Stimulationszwecken in der Kulturschale adhären. Das geht nur unter Zugabe von Vitamin D3 (Calciferol) in einer Konzentration von 1:1000. Dadurch gehen jedoch die monozytären Eigenschaften in makrophagen-ähnliche über.

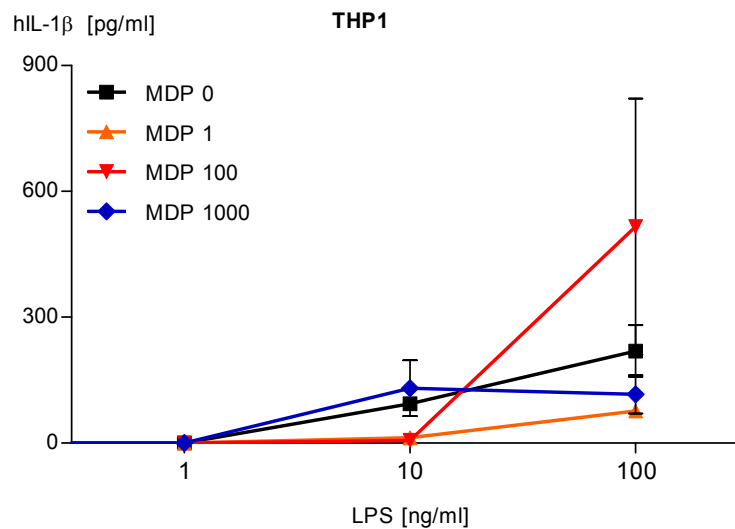


Abb. 14: IL-1 β -Konzentrationen nach Stimulation der humanen THP1-Zelllinie

Die Zellen wurden 6 h mit LPS re595 (1-100 ng/ml) vorinkubiert, danach für 18 h mit verschiedenen Konzentrationen von MDP. Die Überstände wurden nach 24 h gewonnen und im ELISA die mL-1 β -Konzentration gemessen ($p > 0,05$; n.s.)

Die Untersuchung der THP1-Zellen zeigte ebenfalls eine Erhöhung der hIL-1 β -Sekretion nach kombinierter Stimulation mit LPS re595 (100 ng/ml) und MDP (100 ng/ml) (Abb. 14). Der zweite Stimulus (MDP) führte zu einer erhöhten Reifung von zytosolischem proIL-1 β zu sezerniertem IL-1 β . IL-1 β erreichte einen Wert von ca. 500 pg/ml. Eine alleinige LPS-Gabe von 100 ng/ml führte nur zu einer IL-1 β -Konzentration von ca. 200 pg/ml. Die Standardabweichungen sind sehr groß und der zweifache ANOVA-Test ergab, dass dieser Effekt nicht signifikant ist ($p < 0,05$). Somit kann hier nur ein Trend festgestellt werden, bei dem es einer Doppelstimulation von TLR und NOD durch z.B. LPS und MDP bedarf, um Caspase-1 zu aktivieren und ProIL-1 β in die reife Form zu schneiden zu können.

3.3 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR-und NLR-Synergie durch Stimulation mit LPS und MDP

Um zu klären, welcher Zelltyp im Gehirn zur synergistischen IL-1 β -Ausschüttung beiträgt, wurden Kulturen von primären murinen Astrozyten und Mikroglia gezüchtet.

Primäre Maus-Astrozyten wurden wie unter 2.3 beschrieben aus neugeborenen WT-, Nod2^{-/-}-und TLR2/4^{-/-}-C57Bl/6 Mäusen isoliert und kultiviert und in 24-Well Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit LPS O111:B4 und Pam₂Cys für 5 h alleine und in Kombination mit MDP oder ATP für 18 h bzw. 30 min. stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und im ELISA das Zytokin mIL-1 β quantifiziert.

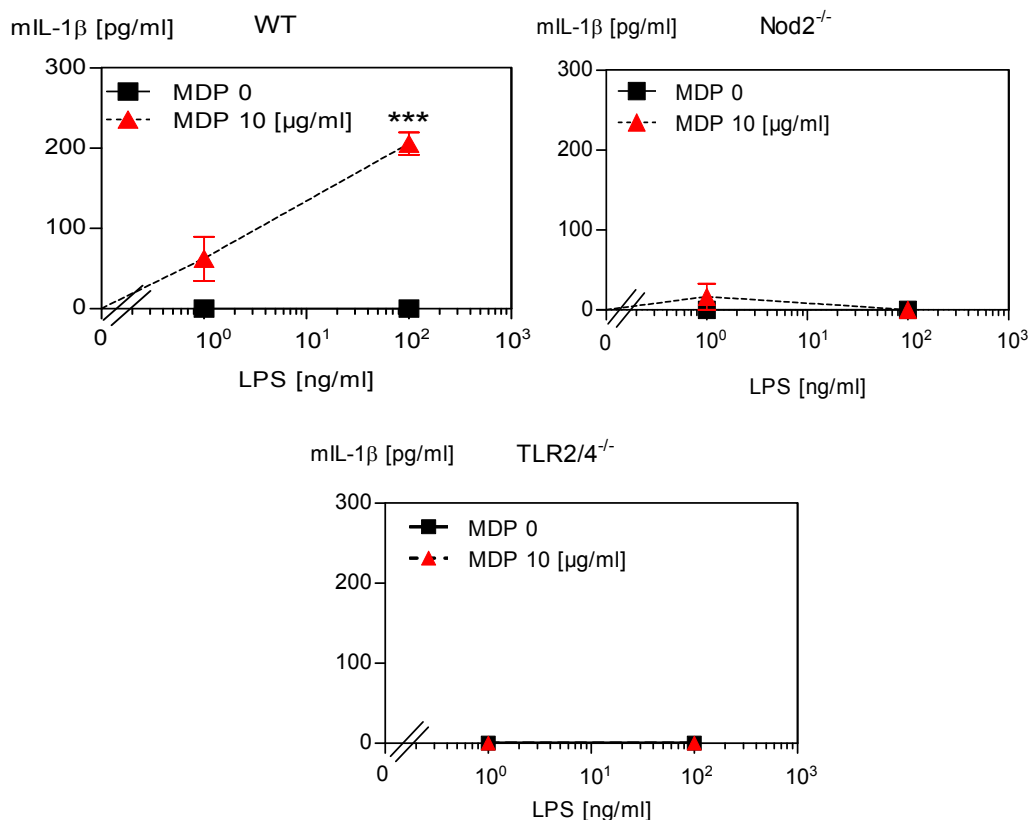


Abb. 15: Muriner IL-1 β -ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und MDP-Stimulation.

Es wurde für 4h stimuliert mit LPS (1-100 ng/ml) und 20h MDP (10 μ g/ml). Nach 24h wurde mit dem Überstand ein mIL-1 β ELISA durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse für WT Astrozyten, Nod2^{-/-}, und TLR2/4^{-/-}-Astrozyten. Pro Genotyp wurden Zellen von 4-5 postnatalen Mäusen stimuliert. Repräsentativ ist ein Ergebnis dargestellt von mindestens drei durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind MW \pm SD. *** p<0,0001 (two-way ANOVA)

Die Ergebnisse der WT-, Nod2^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Astrozyten wurden miteinander verglichen (Abb. 15). Die einzelne Stimulation mit LPS (1 oder 100 ng/ml) sowie mit MDP (10 μ g/ml) führte bei den drei Genotypen zu unterschiedlichen Konzentrationen der IL-1 β -Ausschüttung. Die Kombination beider Liganden miteinander, bzw. die Vorstimulation mit LPS und die nachfolgende Stimulation mit MDP bewirkte bei den WT-Astrozyten einen

signifikanten Anstieg des IL-1 β -Levels auf über 200 pg/ml im Überstand. Die Kombination mit LPS 100 ng/ml und MDP 10 μ g/ml führt demnach zu einer synergistischen IL-1 β -Ausschüttung in WT-Astrozyten der Maus.

Bei den *Nod2*^{-/-}-Astrozyten führte die einzelne Stimulation mit LPS oder MDP zu keiner erhöhten IL-1 β -Ausschüttung im Überstand und auch durch die Kombination beider Liganden konnten keine IL-1 β -Werte im Überstand detektiert werden. Das Fehlen des *NOD2*-Gens durch Knock-out führt bei Mäusen nach Stimulation mit den bakteriellen Liganden LPS und MDP zu einer ausbleibenden IL-1 β -Antwort. Auch die Zellen der TLR2/4^{-/-} Doppel-k.o. Mäuse zeigen keine IL-1 β -Antwort nach Stimulation mit LPS und MDP.

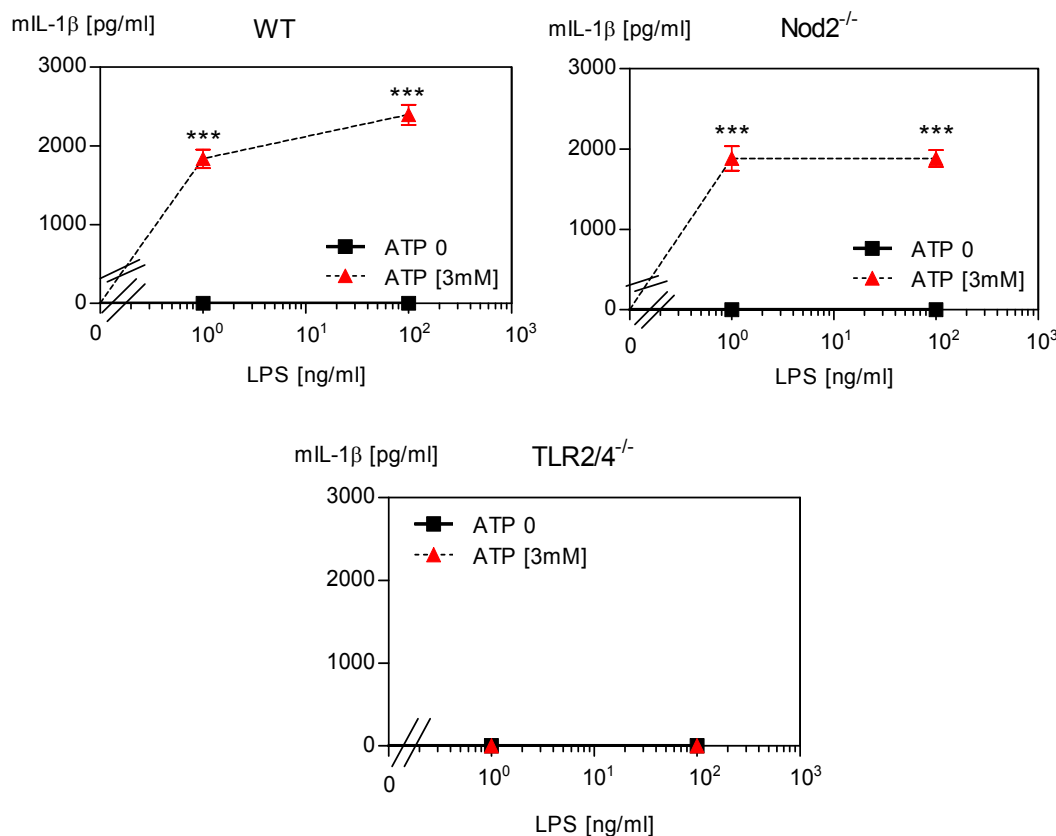


Abb. 16: Muriner IL-1 β -ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und ATP-Stimulation.

LPS wurde für 6h vorstimuliert, danach wurde ATP (3mM) für 30 min. zugegeben. Anschliessend erfolgte die Abnahme der Überstände für die ELISA-Messung von mIL-1 β . Repräsentativ ist ein Ergebnis dargestellt von mindestens drei durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind MW \pm SD. ***p<0,0001

Die Stimulation von LPS mit dem exogenen Stimulus ATP führt auch zu einer stark erhöhten IL-1 β Sekretion (Abb. 16). Die Werte erreichen nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml)

und ATP 3mM bei WT-Astrozyten ca. 2.500 pg/ml. Bei NOD2-defizienten Astrozyten erfolgt ebenfalls eine hohe IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit den gleichen Liganden. LPS stimuliert TLR4 zur Expression von zytosolischem proIL-1 β , das aber noch die Reifung zu IL-1 β braucht. Hier wäre zu erwarten, dass bei Fehlen des NOD2-Rezeptors keine hohen IL-1 β -Werte zustandekommen. ATP scheint also den NOD2-Rezeptor zu umgehen und aktiviert vermutlich auf andere Weise Caspase-1, damit eine IL-1 β -Reifung erfolgen kann. Bei murinen primären Astrozyten kann demnach ein NOD2-*knock-out* nach LPS- und ATP-Stimulation trotzdem zur Bildung von IL-1 β führen.

Das Fehlen von TLR2 und TLR4 (TLR2/4^{-/-}) inhibiert den MyD88-abhängigen Signalweg, und somit die NF- κ B-Aktivierung, es kann kein proIL-1 β exprimiert werden.

3.3.1 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR-und NLR-Synergie durch Stimulation mit Pam₂Cys und MDP

Um herauszufinden, ob die Rezeptoren TLR2 und NOD2 in murinen Astrozyten ebenfalls in synergistischer Weise zusammenarbeiten, um IL-1 β zu produzieren, wurden die primären murinen Astrozyten für 5 h mit 1 oder 100 ng/ml Pam₂Cys vorstimuliert und für weitere 19 h mit 10 μ g/ml MDP inkubiert. Nach 24 h wurde mIL-1 β in den Überständen im ELISA quantifiziert.

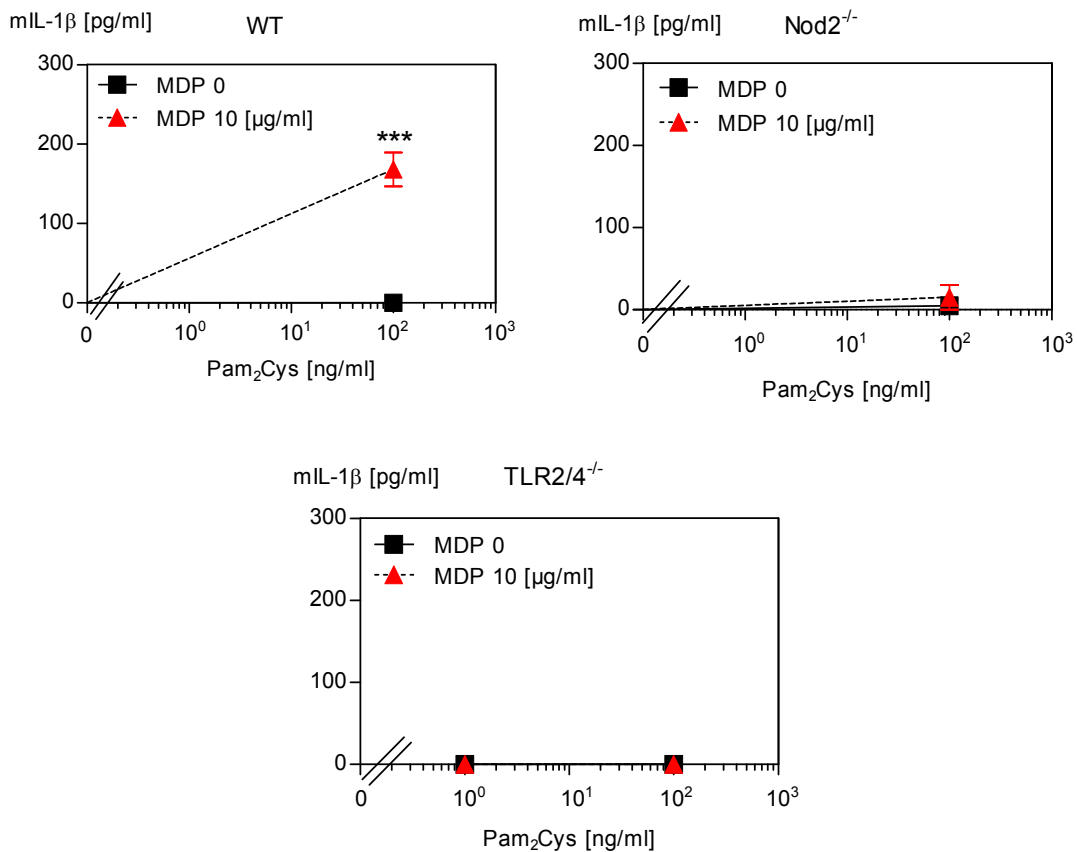


Abb. 17: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Astrozyten nach Pam₂Cys- und MDP-Stimulation.

Die Zellen wurden für 4h mit Pam₂Cys (100 ng/ml) stimuliert und für 20h mit MDP (10 μg/ml). Nach 24h wurde mit dem Überstand ein mIL-1β ELISA durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse für WT-, Nod2^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-Astrozyten. Repräsentativ ist ein Ergebnis dargestellt von mindestens drei durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind MW ± SD. *** p<0,0001

Die Stimulation von TLR2 und NOD2 führte ebenfalls zu einer synergistischen Erhöhung des IL-1β-Zytokins. In Zellen der WT-Mäuse erreichte dieser Wert ca. 180 pg/ml, im Vergleich dazu erreicht der IL-1β-Wert durch Einzelstimulation mit Pam₂Cys kaum ein messbares Level (Abb. 17). Durch den NOD2-*knock-out* ist die Synergie aufgehoben, der Stimulus des NOD2-Rezeptors fehlt. Es wird kaum IL-1β exprimiert. In Zellen mit TLR2/4^{-/-} Doppel-*knock-out* ist gar keine IL-1β-Expression nachweisbar.

3.3.2 Primäre murine Astrozyten zeigen keine synergistische IL-6-Produktion nach Stimulation mit LPS bzw. Pam₂Cys und MDP

Um zu zeigen, dass IL-1β tatsächlich die Doppelstimulation benötigt, um als reifes IL-1β aus der Zelle sezerniert zu werden, wurde ein Ko-Stimulationsversuch durchgeführt, wo-

bei mIL-6 im ELISA quantifiziert wurde. Dieses Zytokin benötigt generell keinen zweiten Stimulus zur Expression und soll daher als Kontroll-Zytokin herangezogen werden.

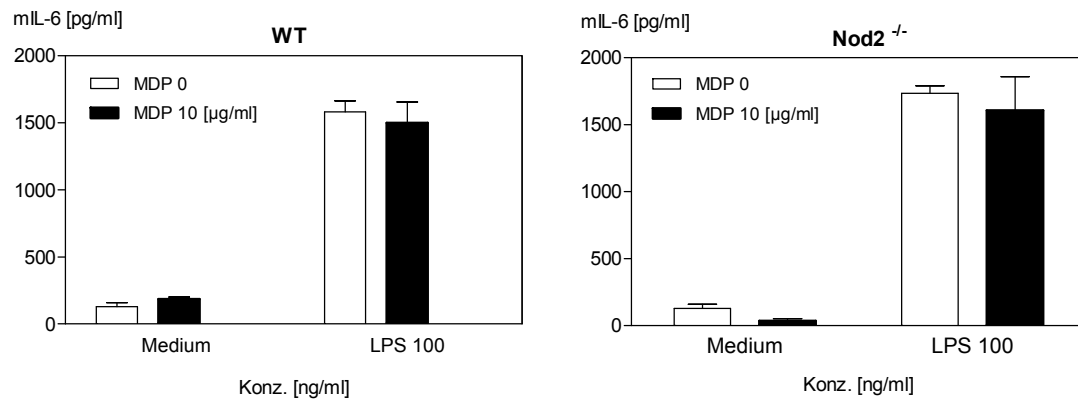


Abb. 18: Muriner IL-6-ELISA von primären murinen Astrozyten nach LPS-und MDP-Stimulation.

Quantifizierung von mIL-6 im ELISA und Vergleich von WT und Nod2^{-/-}. Stimulation mit LPS 100 (ng/ml) für 4h einzeln oder in Kombination mit MDP 10 (μg/ml) für 18h. Die Unterschiede in den Gruppen sind nicht signifikant. Repräsentativ ist ein Ergebnis dargestellt von mindestens drei nacheinander durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind MW ± SD.

Die IL-6-Level zwischen WT-Astrozyten und Nod2^{-/-}-Astrozyten wurden verglichen. Im Gegensatz zu den IL-1β-Ergebnissen gibt es keinen synergistischen Anstieg der IL-6-Sekretion (Abb. 18). Hier reichte die alleinige Stimulation von TLR4 aus, um auf NF-κB-Ebene IL-6 in einer Höhe von 1.500 pg/ml zu exprimieren, wie auch das Ergebnis bei Nod2^{-/-}-Astrozyten zeigte. Der zweite Stimulus ist unnötig.

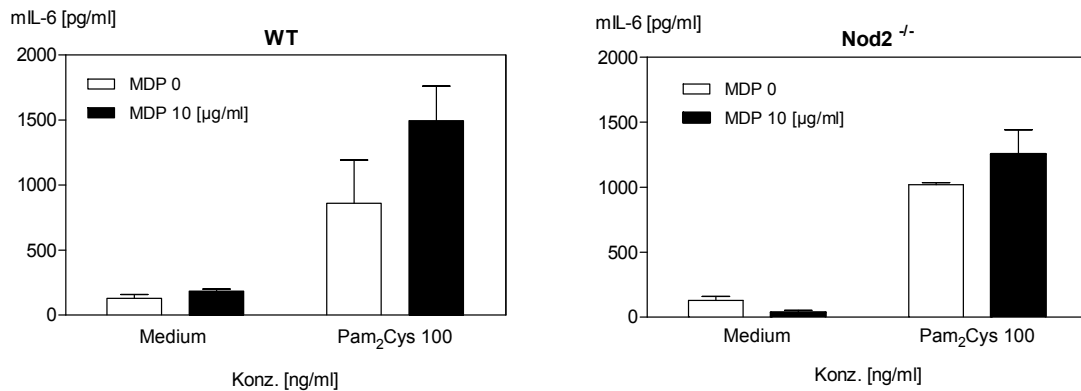


Abb. 19: Muriner IL-6-ELISA von primären murinen Astrozyten nach Pam₂Cys- und MDP-Stimulation.

Quantifizierung von mIL-6 mittels ELISA. Vergleich zwischen WT- und Nod2^{-/-} Zellen. Stimulation mit LPS 100 (ng/ml) für 4h einzeln oder in Kombination mit MDP 10 (µg/ml) für 18h. Die Unterschiede in den Gruppen sind nicht signifikant. Repräsentativ ist ein Ergebnis dargestellt von mindestens drei durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind MW ± SD.

Bei der Stimulation von TLR2 und NOD2 durch Pam₂Cys und MDP (Abb. 19) zeigte sich ebenfalls, dass die alleinige Stimulation von TLR2 ausreicht, um IL-6 bis zu 1.500 pg/ml zu produzieren. Der zweite Stimulus durch MDP führte nicht zu einer synergistischen Erhöhung der IL-6-Level, was darauf hindeutet, dass Caspase-1 bei der IL-6-Regulation nicht beteiligt ist, wohl aber bei der IL-1β-Regulation.

3.3.3 Primäre murine Astrozyten zeigen TLR- und NLR-Synergie bei gleichzeitiger Caspase-1-Aktivität

Nachdem die Überstände der stimulierten murinen Astrozytenzellen für den ELISA abgenommen wurden, konnten die Zellen mittels Lysepuffer lysiert werden. Das Gesamtlisat der Proteine wurde durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die zum Signalweg gehörenden cytoplasmatischen Proteine pro-Caspase-1, aktivierte Caspase-1 und pro-IL-1β durch spezifische Antikörper im Western Blot detektiert.

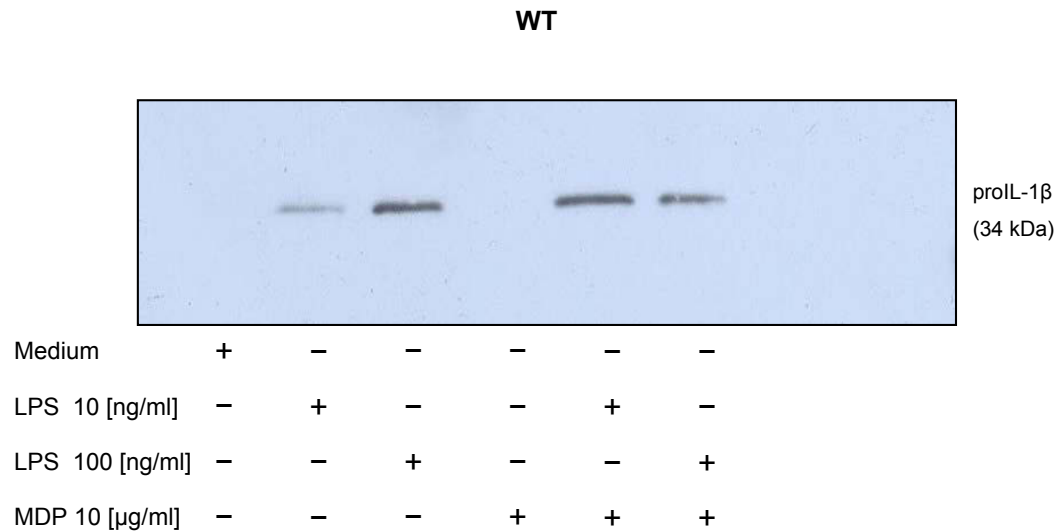


Abb. 20: Western Blot von IL-1 β aus primärem murinen WT-Astrozyten-Lysat.

Proteine im Lysat wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und proIL-1 β mittels Primär-Antikörper (1:250, R&D) und Sekundär-AK (1:5000 donkey anti-goat-HRP, Santa Cruz) im WB detektiert. Die manuelle Filmentwicklung wurde mit dem ECL-Kit durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug 2min.

Im Western Blot wurde das precursor-Protein von IL-1 β detektiert, pro-IL-1 β (Abb. 20). Es läuft bei einer Größe von 34 kDa und deutet darauf hin, dass es in Astrozytenzellen von Wildtyp-Mäusen nach einer Stimulation mit bakteriellem LPS 10 ng/ml, LPS 100 ng/ml und einer Kombination von LPS 10/100 ng/ml und MDP 10.000 ng/ml exprimiert wird. Eine Vorstimulation mit LPS ist also nötig, um das Vorläufer-Protein von IL-1 β zu exprimieren. Eine Inkubation mit reinem Medium oder MDP 10.000 ng/ml führte nicht zu einer pro-IL-1 β -Bande. Die zum Signalweg gehörenden cytoplasmatischen Proteine pro-Caspase-1 und aktivierte Caspase-1 wurden im nächsten Versuch untersucht.

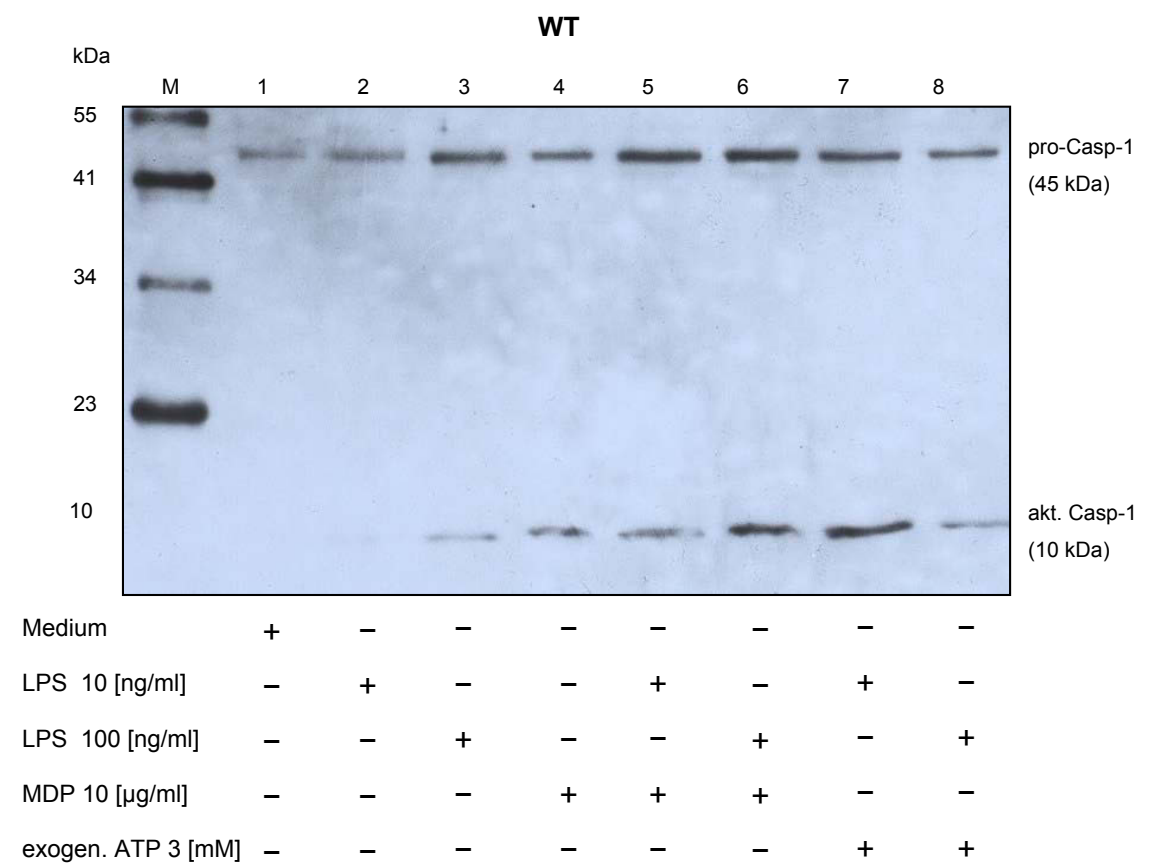


Abb. 21: Western Blot von Caspase-1 aus primärem murinen WT-Astrozyten-Lysat.
Die Zellen wurden mit dem Primär-AK mCasp-1 (sc-514) 1: 500 1h und Sekundär-AK goat anti-rabbit-HRP 1:5000 für 2h inkubiert. Die Belichtungszeit betrug 1h.

Das Vorläufer-Protein von Caspase-1, pro-Casp-1 (45 kDa), ist in murinen Astrozyten ein konstitutiv exprimiertes Protein (Abb. 21). Ohne Stimulation (Medium) kommt es zu einer pro-Casp-1-Expression. Die Expression wurde stärker, nachdem mit 10 µg/ml MDP und 10 bzw. 100 ng/ml LPS stimuliert wurde. Je mehr proCasp-1 gebildet wurde, desto öfter wurde diese in einer autokatalytischen Weise zu aktivierter Casp-1 geschnitten, so dass bei diesen Konzentrationen vermehrt aktivierte Casp-1 (10 kDa) im Cytosol nachzuweisen war. Dies könnte erklären, warum in den Überständen eine hohe IL-1β-Konzentration vorlag, bei gleichzeitiger Stimulation von TLR4 bzw. TLR2 und Nod2. Beide Rezeptoren brauchen einen Stimulus, um ihren Teil zur IL-1β-Reifung beizutragen (NF-kB-Aktivierung durch TLR4 und Caspase-1-Aktivierung über Nod2). Bei Nod2^{-/-}-mutierten Mäusen findet die Caspase-1-Aktivierung nicht statt.

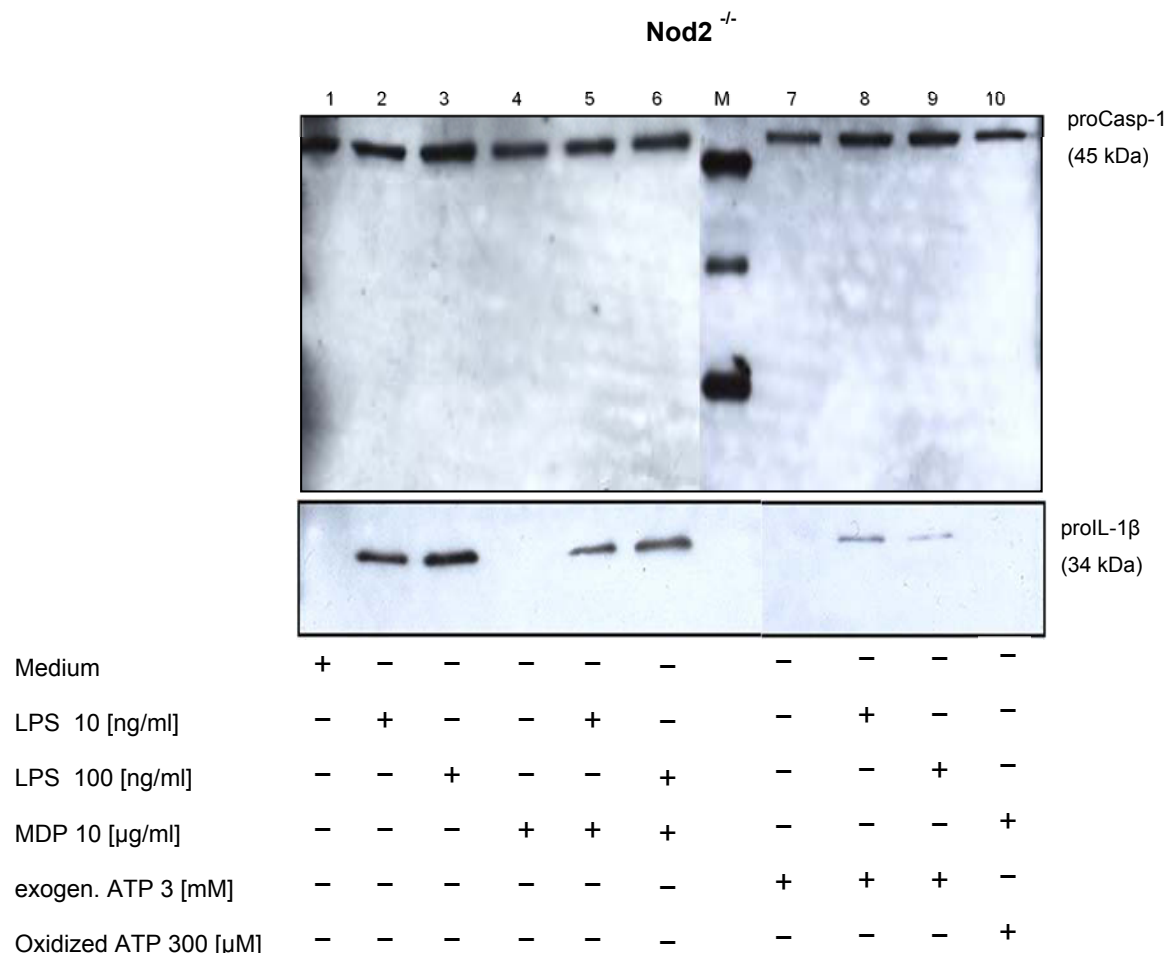


Abb. 22: Western Blot von Caspase-1 und IL-1β aus primärem murinen Nod2^{-/-}-Astrozyten-Lysat.

Proteine im Lysat wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und proIL-1β mittels Primär-AK (1:250, R&D) und Sekundär-AK (1:5000 donkey anti-goat-HRP) und (pro)Casp-1 mit dem Primär-AK mCasp-1 (sc-514) 1: 500 1h und Sekundär-AK goat anti-rabbit-HRP 1:5000 2h im WB detektiert (M=Marker). Belichtungszeit: 1h.

Im Lysat der Nod2^{-/-}-Astrozyten lag proIL-1β in gleicher Weise vor wie bei WT-Astrozyten, wenn mit 10 oder 100 ng/ml LPS stimuliert wurde (Abb 22). MDP (10 μg/ml) und ATP (3mM) tragen nicht zur proIL-1β-Expression bei. ProCaspase-1 liegt konstitutiv vor. Bei gleichzeitiger (Doppel-) Stimulation von LPS und MDP bzw. ATP trat keine aktivierte Caspase-1 im Zytoplasma auf, d.h. dass bei Knock-out des NOD2-Rezeptors in murinen Astrozyten die Aktivierung der proCaspase-1 (45 kDa) zu Caspase-1 (10 kDa) nicht stattfindet. Trotzdem kann es sein, dass neben NOD2 noch andere Interaktionspartner für den Liganden MDP vorliegen, z.B. NLRP3 des Inflammasoms. Bei Nod2-Defizienz ist

anzunehmen, dass MDP bei Fehlen von NOD2 keinen Einfluss auf die Aktivierung von Caspase-1 nehmen kann. Das wird auch aus den ELISA-Ergebnissen der Astrozyten-Überstände ersichtlich. Es lagen bei Nod2-Defizienz keine hohen IL-1 β -Werte vor (Abb. 15). Es ist auch nicht anzunehmen, dass es einen NOD2- und Caspase-1-unabhängigen Mechanismus gäbe, z. B. die Aktivierung von NLRP3 oder NLRP1 durch MDP. Jedoch kann man davon ausgehen, dass ein NOD2- und Caspase-1-unabhängiger Mechanismus existiert, wenn mit ATP stimuliert wird, wie in den ELISA-Untersuchungen ersichtlich wurde (Abb. 16). Es konnten IL-1 β -Werte bis 2000 pg/ml beobachtet werden. Das oxidierte ATP wurde als P₂X₇-Rezeptor-Antagonist eingesetzt, das die Wirkung von ATP inhibiert. Im Western Blot ist keine Auswirkung auf Caspase-1-Inhibition zu beobachten, da keine Caspase-1 aktiviert wurde. Möglicherweise entfalten hier alternative Proteasen ihre Wirkung auf die IL-1 β -Regulation.

3.4 Die Astrozyten-ähnliche humane U-87MG-Zelllinie zeigt TLR- und NLR-Synergie durch Stimulation mit LPS bzw. Pam₂Cys und MDP

Die humane Zelllinie U-87MG (ECACC, UK) entstammt ursprünglich einem Astrozytom, einem Krebsleiden, das Astrozyten-Zellen betrifft. Deshalb kann angenommen werden, dass sich die U-87MG Zelllinie ähnlich den humanen Astrozyten-Zellen verhält. Astrogliale Zellen sind für ihre Stützfunktion und nährstoffbereitstellende Funktion im Gehirn bedeutend. Relativ wenig ist über ihre Fähigkeit zur Immunabwehr bekannt.

Um herauszufinden, ob Astrozyten in einer synergistischen Weise von TLRs und NLRs nach Stimulation mit bakteriellen Liganden das Zytokin IL-1 β sekretieren können, wurde dieser Versuch mit Hilfe von LPS O111:B4 bzw. Pam₂Cys und MDP durchgeführt. LPS wurde allein und in Kombination mit MDP in einer Konzentration von 10 und 100 ng/ml für 6 h zugegeben. Pam₂Cys wurde allein oder in Kombination mit MDP in einer Konzentration von 100 ng/ml für 6 h zugegeben. MDP wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml für 18 h zugegeben. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und im hIL-1 β -ELISA analysiert.

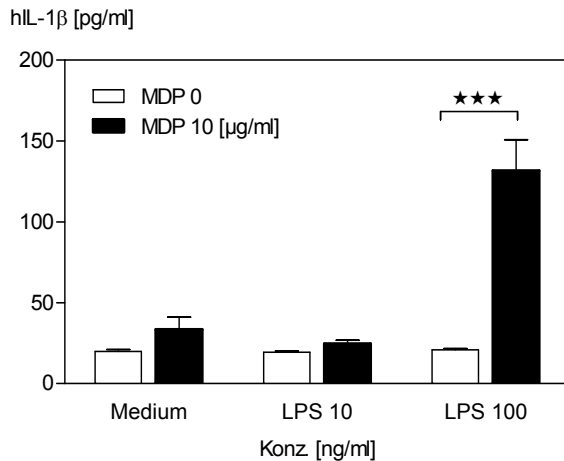


Abb. 23: Humaner IL-1 β -ELISA von U-87-Zellen nach LPS-und MDP-Stimulation.

6h stimuliert mit LPS (10 und 100 ng/ml) und 18h MDP (10 μ g/ml). Überstände wurden mittels ELISA auf hIL-1 β überprüft. In den Gruppen, die mit und ohne MDP stimuliert wurden, liegt eine hohe Signifikanz der Varianz vor: *** $p < 0,001$ (two-way ANOVA)

Es zeigte sich, dass Zellen der U-87-Zelllinie nach einer Ko-Stimulation des TLR4 und Nod2-Rezeptors mit 100 ng/ml LPS und 10 μ g/ml MDP in einer synergistischen Weise IL-1 β exprimieren (bis 150 pg/ml) und in den Überstand sekretieren (Abb. 23). Eine Ko-Stimulation des TLR2 und Nod2-Rezeptors der U-87-Zelllinie mit dem synthetischen Lipopeptid 100 ng/ml Pam₂Cys und 10 μ g/ml MDP resultiert ebenfalls in einer Sekretierung des IL-1 β -Zytokins (bis zu 600 pg/ml) in den Überstand (Abb. 24). Diese ist jedoch nicht signifikant erhöht, im Vergleich zum Einzelstimulus durch MDP.

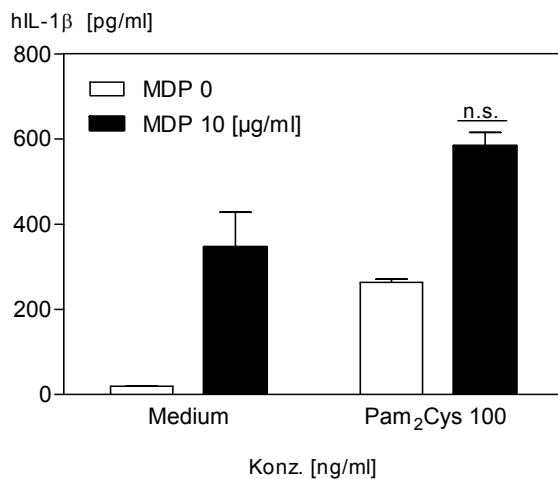


Abb. 24: Humaner IL-1 β -ELISA von U-87-Zellen nach Pam₂Cys-und MDP-Stimulation.

6h stimuliert mit Pam₂Cys (100 ng/ml) und 18h MDP (10 μ g/ml). Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA hIL-1 β gemessen. n.s., nicht signifikant nach two-way ANOVA.

U-87-Zellen reagieren ebenfalls auf die Stimulation durch TLR2 und Nod2 mit der Sekretion von IL-1 β , jedoch nicht in signifikanter Weise wie bei der LPS-MDP-Doppelstimulation (Abb. 24). Trotzdem erkennt man den Nutzen der Doppelstimulation des TLR – und NLR-Rezeptors, nämlich der drastischen Erhöhung der IL-1 β -Freisetzung.

Astrozyten tragen demnach deutlich zur Immunantwort nach bakterieller Invasion im ZNS bei und unterstützen die Mikrogliazellen bei der Bekämpfung der Pathogene.

3.4.1 Die humane U-87MG-Zelllinie zeigt TLR-und NLR-Synergie bei gleichzeitiger Caspase-1-Aktivität

Nachdem die Überstände für die ELISA-Messungen abgenommen wurden, konnten die Zellen lysiert und für den Western Blot aufbereitet werden. Es wurde der Einfluss von Caspase-1 auf die Reifung von proIL-1 β zu reifem IL-1 β untersucht.

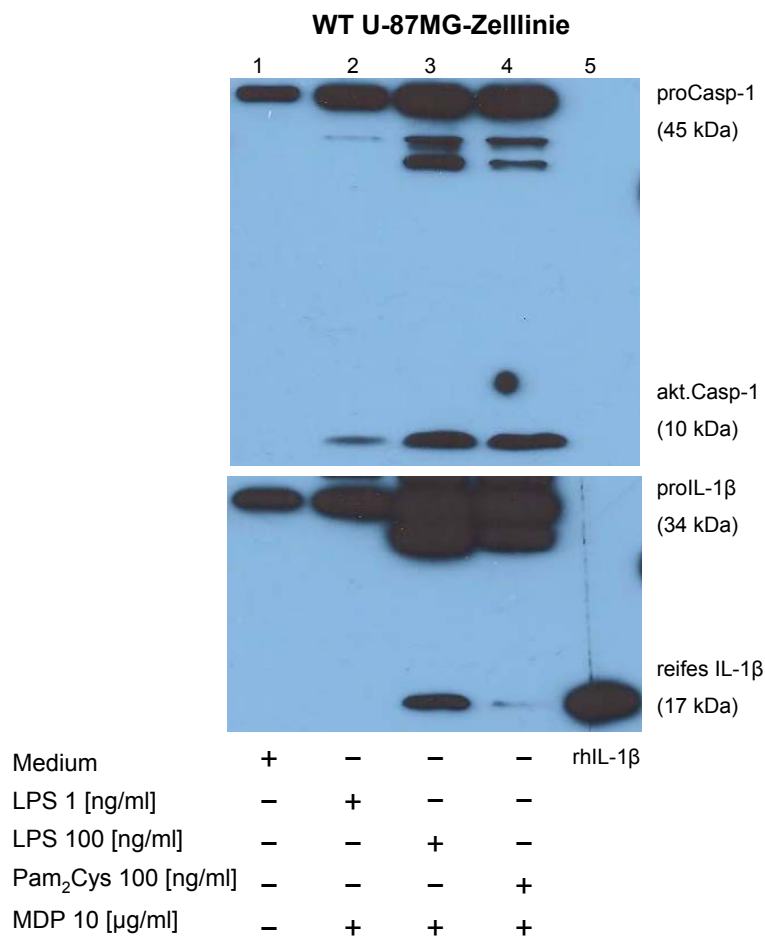


Abb. 25: Western Blot von Caspase-1 und IL-1 β aus humanem U-87MG-Lysat.

Mit den primären Antikörpern sc-515 (1:400, Santa Cruz) und #2022 (1:750, Cell Signaling) wurden sowohl die Precursor-Form als auch die aktivierte, bzw. reife Form von Caspase-1 und IL-1 β detektiert. Sekundär-AK waren in beiden Blots goat anti-rabbit (1:4000 und 1:7500). Belichtungszeit für Casp-1 Blot: 12 min, für IL-1 β : 20 min (rhIL-1 β =rekombinantes humanes IL-1 β).

Im Western Blot wurde die Caspase-1-Aktivierung untersucht (Abb. 25). In einem Vorversuch wurde untersucht, ob LPS 1,100 und Pam₂Cys 100 (ng/ml) sowie MDP 10 (µg/ml) allein eine Caspase-1-Aktivierung zur Folge hatten. Dem war nicht so. Die Kombination von LPS 1 und 100 ng/ml und MDP 10 µg/ml hatte eine Caspase-1-Aktivierung zur Folge. Auch Pam₂Cys 100 ng/ml und MDP konnten diesen Effekt hervorrufen. Somit scheint in der humanen Astrozyten-Zelllinie U-87MG eine Abhängigkeit von der MDP-Stimulation zu bestehen. Hieraus ist jedoch nicht ersichtlich, ob diese Aktivierung NOD2-abhängig ist oder ob ein anderer zytoplasmatischer Rezeptor, z.B. NLRP3 oder NLRP1 dafür verantwortlich ist.

3.5 Primäre murine Mikroglia zeigen keine Synergie in der IL-1 β -Ausschüttung nach Stimulation mit LPS und MDP, jedoch nach LPS- und ATP-Stimulation

Mikroglia im ZNS sind mononukleäre Phagozyten und stammen von den Monozyten/Makrophagen der Peripherie ab. Sie besitzen ähnliche Funktionen und ein ähnliches Antigenpektrum. Es wurde mittels ELISA die IL-1 β -Konzentration in Zellüberständen nach einfacher und Doppelstimulation mit LPS und MDP nach 24 h-Inkubation gemessen.

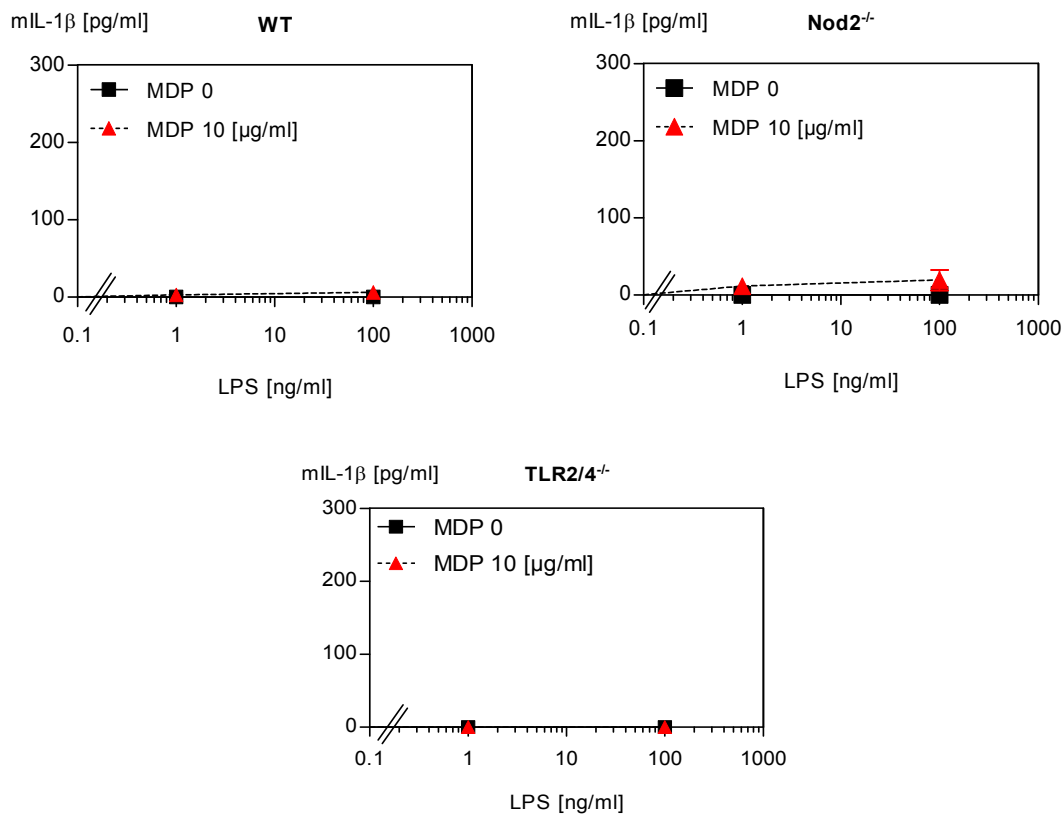


Abb. 26: Muriner IL-1β-ELISA von primären murinen Mikroglia nach LPS-und MDP-Stimulation. WT-, NOD2^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-Mikroglia wurden für 6h mit 1 und 100 ng/ml LPS gepreimt und 18h mit 10 μM MDP inkubiert. $p > 0,05$ für WT, NOD2^{-/-} und TLR2/4^{-/-} (two-way ANOVA)

Primäre murine WT-Mikroglia hatten nach Stimulation mit LPS (1-100 ng/ml) und MDP (10 μg/ml) eine kaum nachweisbare IL-1β-Sekretion (Abb. 26). Die IL-1β-Werte lagen bei < 50 pg/ml und waren nicht von den Werten nach Einzelstimulation mit LPS zu unterscheiden. Weder WT-, Nod2^{-/-}- noch TLR2/4^{-/-}-Mikroglia zeigen den IL-1β-Synergismus nach LPS-und MDP-Stimulation.

WT-Mikroglia konnten weder nach 6 h Stimulation mit 1 ng/ml LPS und 18 h Stimulation mit MDP noch mit 100 ng/ml LPS und MDP einen Anstieg der IL-1β-Konzentration im Zellüberstand erreichen. Da die Gene *Nod2* und *Tlr2/4* in den Tieren ausgeknockt waren, konnte auch hier kein reifes IL-1β gebildet werden. Es gab keine TLR-NLR-Synergie.

Auch der Vergleich zwischen WT-, Nod2^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-Mikroglia offenbart, dass die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β nach Doppelstimulation mit Pam₂Cys und MDP nicht durch eine synergistische Aktion der Rezeptoren bewirkt wird. Da Mikroglia der monozytären Linie angehören und eng mit den peripheren Makrophagen verwandt sind, wäre anzunehmen, dass Mikroglia eine starke IL-1 β -Produktion besitzen und dass es ähnlich wie bei RAW264.7-Zellen nach einer Doppelstimulation mit bakteriellen Liganden, die TLR2 und NOD2 triggern, zu einer synergistischen Aktivierung kommt. Nach Stimulation mit LPS und ATP wurde eine synergistisch erhöhte IL-1 β -Sekretion im Überstand gemessen (Abb. 27).

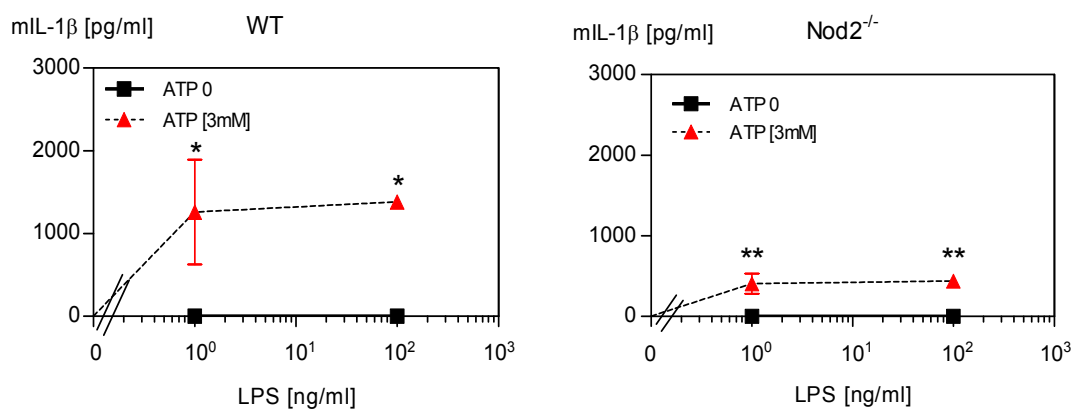


Abb. 27: Muriner IL-1 β -ELISA von primären murinen Mikroglia nach LPS- und ATP-Stimulation. WT- und NOD2^{-/-}-Mikroglia wurden für 4h mit 1 und 100 ng/ml LPS geprimt und 1h mit 3 mM ATP inkubiert. * p<0,05; ** p<0,01 (two-way ANOVA)

3.5.1 Primäre murine Mikroglia und die zytosolische Aktivierung von Caspase-1

Die Überstände der stimulierten murinen Mikroglia wurden für die ELISA-Messungen abgenommen und die im Well adhärierenden Zellen mittels Lysepuffer lysiert. Danach konnten die Proteine ihrer Größe nach in der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Im Western Blot wurden dann die Proteine mittels Antigen-Antikörper-Bindung herausgefiltert, die in dieser Arbeit von Interesse waren. Es wurden die Mikroglialysate von WT- und Nod2-defizienten Mäusen auf proCaspase-1, Caspase-1, proIL-1 β und IL-1 β untersucht.

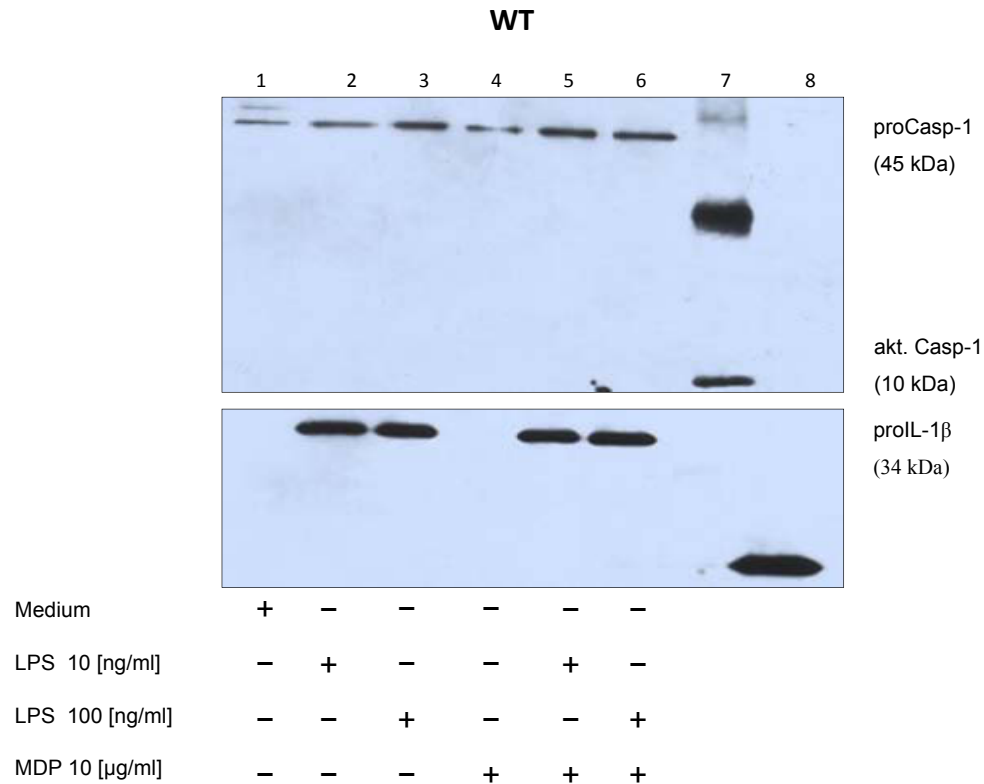


Abb. 28: Western Blot von Caspase-1 und IL-1 β aus primärem murinen WT-Mikroglia-Lysat.

In Spur 7 und 8 sind Positivkontrollen für aktivierte Caspase-1 und reifes IL-1 β aufgetragen. Pro-Caspase-1 wird konstitutiv exprimiert und proIL-1 β nur nach LPS-Stimulation (Spur 2+3 und 5+6). Mikroglia-Lysat eines p2-Wurfes (5 Gehirne). ProIL-1 β wurde mittels Primär-AK (1:250, R&D) und Sekundär-AK (1:5000 donkey anti-goat-HRP) und (pro)Casp-1 mit dem Primär-AK mCasp-1 (sc-514) 1: 500 1h und Sekundär-AK goat anti-rabbit-HRP 1:5000 2h im WB detektiert. Belichtungszeit: 2 min.

Im Western Blot wurde stimuliertes WT-Mikroglia Lysat daraufhin untersucht, ob eine Caspase-1-Aktivierung stattgefunden hat (Abb. 27). Im Western Blot wurde konstitutiv exprimierte ProCaspase-1 detektiert, jedoch keine aktive Caspase-1, die zur Reifung des ProIL-1 β beigetragen hätte. Um die Ergebnisse aus den Primärzell-Versuchen zu bestätigen, wurde die Mikroglia-ähnliche Zelllinie BV-2 herangezogen und in gleicher Weise wie die Primärzellen stimuliert. Auch die BV-2 Zellen zeigten keine Synergie in der IL-1 β -Sekretion nach TLR-und NLR-Stimulation.

3.6 Primäre murine Peritonealmakrophagen zeigen TLR-und NLR-Synergie

Primäre murine Peritonealmakrophagen wurden gewonnen, indem adulten Mäusen subkutan Thioglycolat ins Peritoneum injiziert wurden. Nach 5 Tagen konnten die sich stark vermehrten Peritonealmakrophagen entnommen werden. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt, um eventuell vorhandene Erythrozyten zu entfernen und um eine reine Makrophagenlösung zu erhalten.

Diese wurden gezählt und zu je 5×10^5 Zellen pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen durften sich drei Tage anpassen, bevor sie stimuliert wurden. Die Peritonealmakrophagen der weiblichen und männlichen Mäuse wurden zu jeder Zeit gleich behandelt und stimuliert.

3.6.1 Die TLR-und NLR-Synergie ist Östrogen-abhängig in primären Peritonealmakrophagen von weiblichen Nod2^{-/-}-Mäusen

Die Peritonealmakrophagen, die den weiblichen Mäusen entnommen wurden, wurden in Doppelbestimmungen mit dem ersten Stimulus 10 und 100 ng/ml LPS bzw. Pam₂Cys für 5 h inkubiert. Nach 5 h wurde das Stimulationsmedium entfernt, die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und dann für 19 h in Medium mit dem zweiten Stimulus 10.000 ng/ml MDP oder für 30 min. mit 3mM ATP inkubiert. Das Medium der Zellen, die mit der Kombination LPS und ATP (Pam₂Cys und ATP) stimuliert wurden, wurde nach ca. 6h entfernt und bei -20°C gelagert. Das Medium der Zellen mit LPS- und MDP- (Pam₂Cys und MDP) Stimulation wurde nach 24 h entfernt und ebenfalls bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde ein IL-1 β -ELISA mit den Überständen durchgeführt.

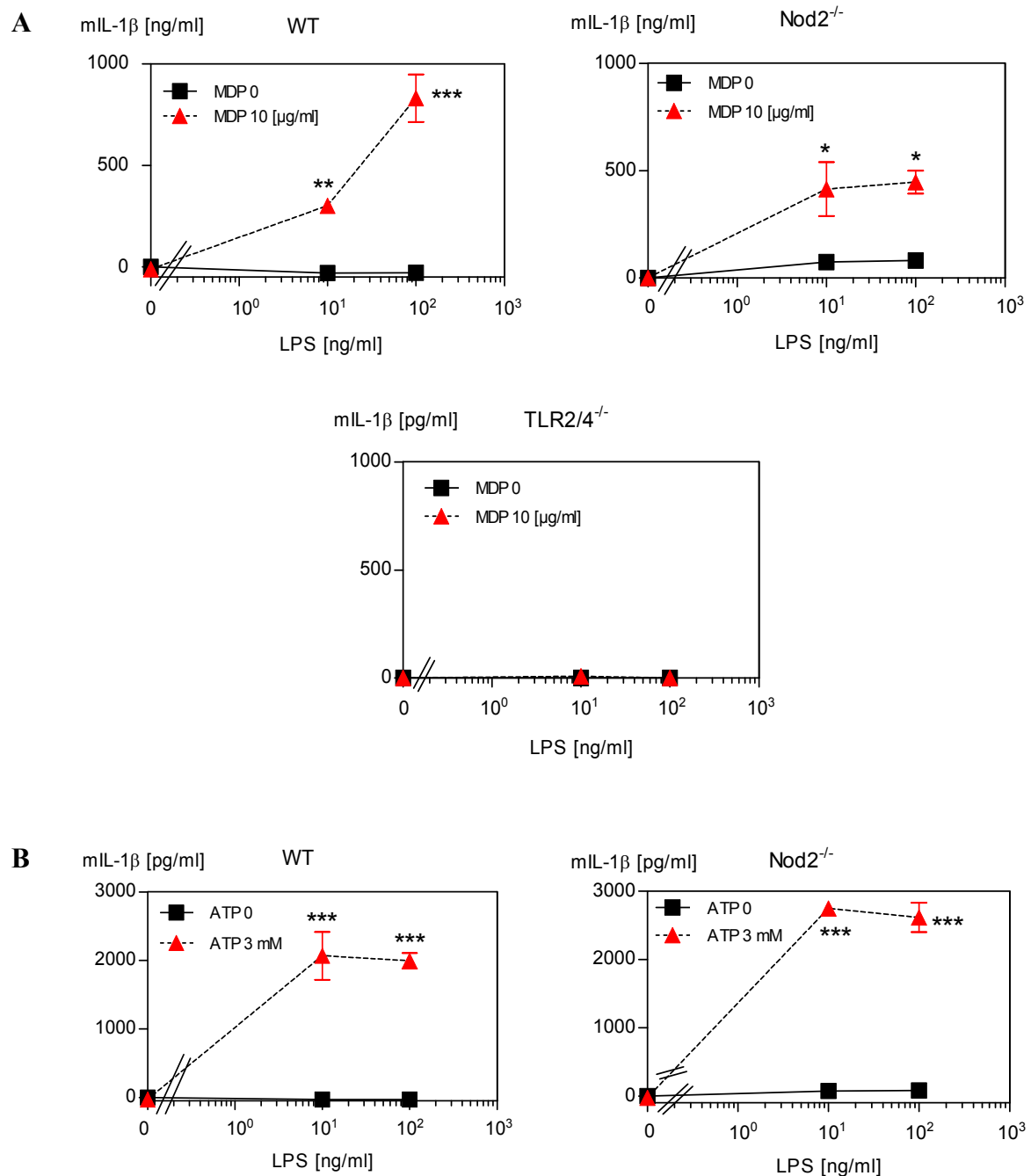


Abb. 29: Muriner IL-1β-ELISA von weiblichen primären murinen Peritonealmakrophagen nach LPS- und MDP- bzw. ATP-Stimulation

Die Zellen wurden 5h stimuliert mit 10 und 100 ng/ml LPS und 19h mit **A** 19h mit MDP 10.000 ng/ml und **B** 30 min. mit ATP 3mM. Nach 24h wurde IL-1β im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Das Experiment wurde mit einer Anzahl von n=3 gepoolten Mäusen für jeden Genotyp durchgeführt (Two-way ANOVA, *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05)

Peritonealmakrophagen der Wildtyp-Mäuse haben nach TLR4- und Nod2-Stimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml LPS und 10 µg/ml MDP einen synergistischen Anstieg der IL-1 β Sekretion, bis auf 900 pg/ml. Diese Zellen benötigen einen Doppelstimulus von TLR und NLR, um eine synergistische IL-1 β -Sekretion zu erreichen. Ohne den zweiten Stimulus durch den bakteriellen Liganden MDP wird kaum reifes IL-1 β produziert.

Unerwarteter Weise zeigten auch die Peritonealmakrophagen der Nod2-defizienten Mäuse bei gleichen Konzentrationen der bakteriellen Liganden einen synergistischen IL-1 β -Anstieg bis auf 500 pg/ml, was bei Fehlen des Nod2-Gens nicht zu erwarten gewesen wäre. Wenn das Nod2-Gen ausgeknockt ist, muss die IL-1 β -Reifung über einen anderen Mechanismus (eventuell anderer NLR-Rezeptor?) erfolgen, der die Caspase-1 aktiviert und diese das proIL-1 β in reifes IL-1 β schneiden kann. Vermutlich ist das Auftreten der synergistischen IL-1 β -Sekretion bei Nod2-k.o. Mäusen unter Einfluss von Östrogenen zu erklären, denn bei männlichen Mäusen tritt dieser Effekt nicht auf. In Abb. 28 **B** fällt auf, dass WT- und NOD2-defiziente Maus-Weibchen ähnlich hohe IL-1 β -Werte aufweisen (2000 bis 2.800 pg/ml). Inwieweit dies einer möglichen Östrogen-abhängigen Caspase-1-Aktivierung geschuldet ist, wird im nachfolgenden Western Blot untersucht.

3.6.1.1 Die TLR-und NLR-Synergie bei weiblichen primären NOD2^{-/-}-Zellen tritt gleichzeitig mit Caspase-1-Aktivität auf

Mittels Western Blots der zytoplasmatischen Proteine ProCaspase-1, aktivierte Caspase-1, ProIL-1 β , reifes IL-1 β , ASC und β -Actin sollten Unterschiede in der Aktivierung dieser Proteine in der weiblichen WT- und NOD2^{-/-}-Maus untersucht werden.

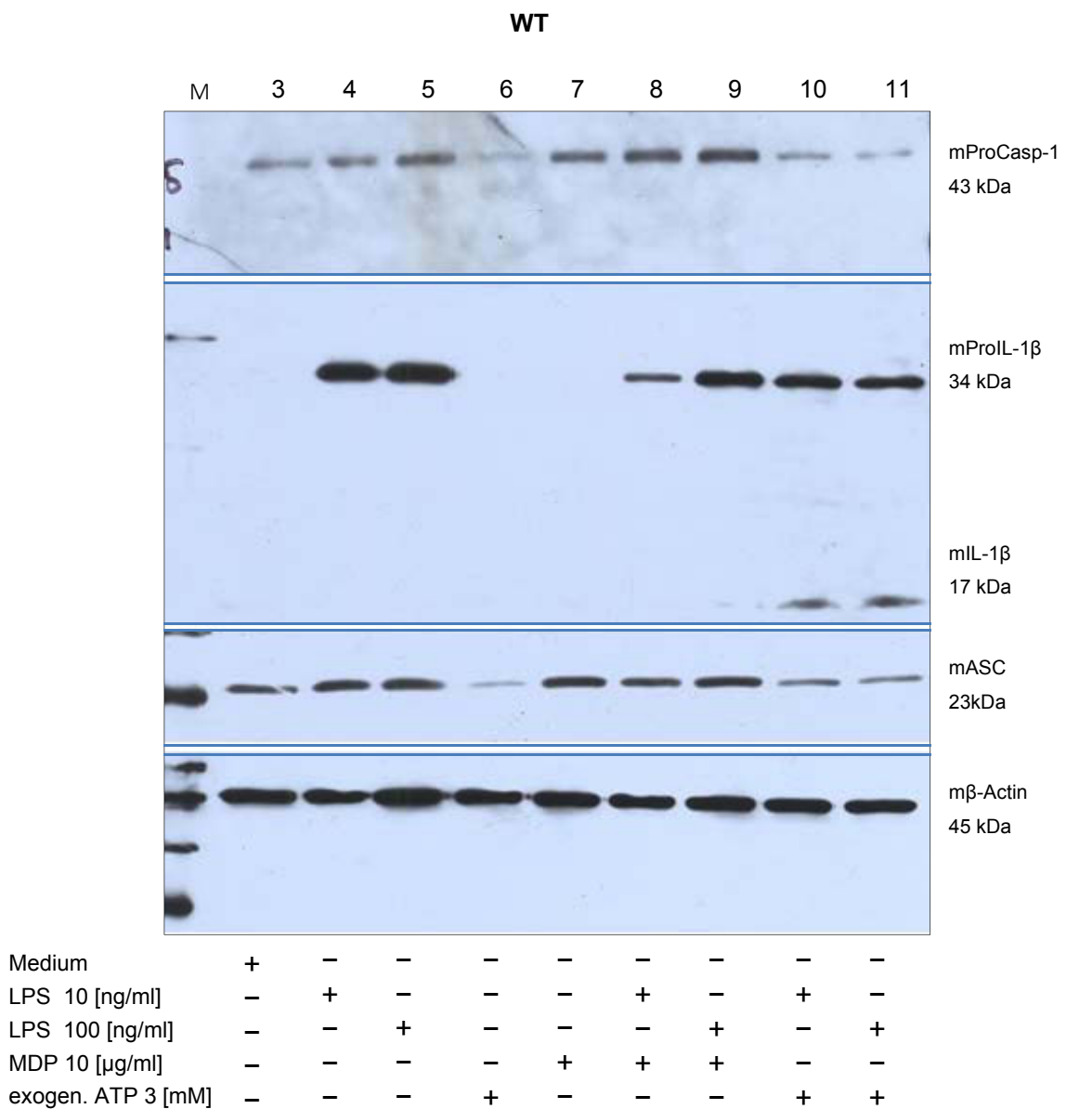


Abb. 30: Western Blot von Caspase-1, IL-1β, ASC und β-Actin aus Peritonealmakrophagen-Lysat der weiblichen WT-Maus.

Stimulation mit LPS und MDP bzw. ATP in verschiedenen Konzentrationen. Inkubation mit mCasp-1AK 1:500, mIL-1β-AK 1:250, mASC-AK 1:500, mβ-Actin-AK 1:500; Belichtungszeit: 2h, 2min, 30s, 1min.

ProCaspase-1 wird nach Stimulation mit oder ohne (Medium) Liganden konstitutiv exprimiert (Abb. 29). Bei der Stimulation mit 3 mM ATP wurde aber deutlich weniger pro-Caspase-1 exprimiert als bei den anderen Ligandenkonzentrationen, was auf eine Inhibition hindeuten könnte (Spur 6, 10 und 11). In diesem Versuch konnte keine aktivierte Caspase-1 (bei 10 kDa) im Zytoplasma nachgewiesen werden, dennoch ist in den Über-

ständen nach ELISA-Messung das reife IL-1 β nachweisbar (Abb. 16, ca. 800 pg/ml IL-1 β). ProIL-1 β ist als deutliche Bande (34 kDa) in den Spuren zu finden, wenn mit LPS 10 oder 100 ng/ml stimuliert wurde. Dies zeigt die zuverlässige Aktivierung von NF- κ B nach TLR4-Aktivierung durch LPS. Überall dort, wo nicht mit LPS stimuliert wurde, lässt sich auch kein ProIL-1 β nachweisen. In den Spuren 10 und 11 erscheint eine schwache Bande bei ca. 17 kDa was eindeutig dem reifen IL-1 β zugeordnet werden kann. Scheinbar wurde nicht das ganze reife IL-1 β aus der Zelle in den Überstand sezerniert, so dass sich noch Reste im Zytoplasma befinden. Die Stimulation mit LPS und ATP scheint Caspase-1-unabhängig zu sein, da im Western Blot, in dem mit Caspase-1-AK inkubiert wurde, keine aktivierte Caspase-1 zu finden war (Spur 10 und 11). Das Protein ASC gehört zum Immunkomplex des Inflammasoms und scheint ebenfalls konstitutiv exprimiert zu werden. Wie bei ProCaspase-1 erscheint die Bande schwächer nach Stimulation mit 3mM ATP (Spur 6, 10 und 11). β -Actin wird als Positivkontrolle mitaufgeführt, um ein konstitutiv exprimiertes Housekeeping-Gen zu zeigen, das unabhängig von den Genen des Immunsystems ist.

Die Reifung von IL-1 β nach LPS und ATP Stimulation erscheint Caspase-1-unabhängig, da sich keine aktivierte Caspase-1 (10 kDa) detektieren lässt (Spur 11). Auch proCaspase-1 wird nur schwach exprimiert. Somit wird auch diese IL-1 β -Reifung NOD2-unabhängig sein.

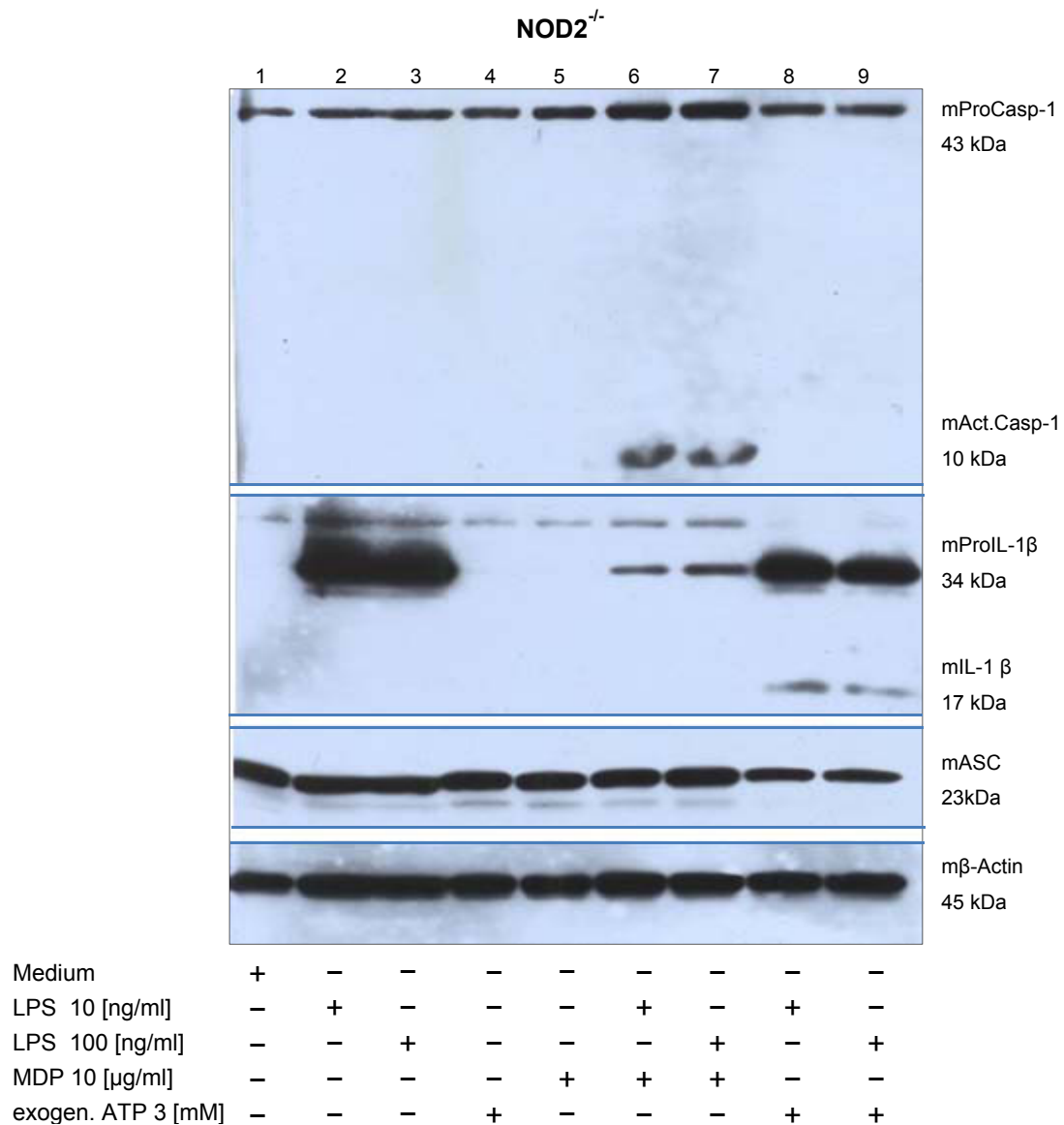


Abb. 31: Western Blot von Caspase-1, IL-1 β , ASC und β -Actin aus Peritonealmakrophagen-Lysat aus der weiblichen NOD2^{-/-}-Maus.

Stimulation mit LPS und MDP bzw. ATP in verschiedenen Konzentrationen. Inkubation mit mCasp-1AK 1:500, mIL-1 β -AK 1:250, mASC-AK 1:500, m β -Actin-AK 1:500; Belichtungszeit: 2h, 2min, 30s, 1min.

Bei den NOD2^{-/-}-Peritonealmakrophagen der Maus-Weibchen lässt sich feststellen, dass ProCaspase-1 konstitutiv nach allen Ligandenkonzentrationen exprimiert wird (Abb. 30). Unerwarteterweise finden sich hier zwei Banden in Spur 6 und 7, die auf aktivierte Caspase-1 (10 kDa) hinweisen. Wie sich schon in den ELISA-Messungen zeigte (Abb. 16), wird IL-1 β synergistisch nach Doppelstimulation mit LPS (10 und 100 ng/ml) und MDP (10

µg/ml) sezerniert, was bei NOD2^{-/-}-Peritonealmakrophagen nicht zu erwarten gewesen wäre. In diesem Western Blot zeigt sich nun, dass die Caspase-1 nach Stimulation mit MDP aktiviert wird, obwohl der NOD2-Rezeptor fehlt, um Caspase-1 durch CARD-CARD-Interaktion zu aktivieren. Entweder muss es einen NOD2-unabhängigen Mechanismus geben, der Caspase-1 aktiviert (z.B. durch NLRP3) oder ein Mechanismus der ganz ohne Caspase-1 auskommt, z.B. durch alternative Proteasen. Da diese hohe IL-1β-Produktion bei NOD2-Defizienz nur bei Weibchen vorkommt, muss vermutet werden, dass hier unbekannte hormonabhängige (17β-Östradiol) Mechanismen wirken. ProIL-1β wird unabhängig vom Fehlen des NOD2-Rezeptors durch Stimulation mit LPS über den TLR4-Rezeptor und anschließender NF-κB-Aktivierung exprimiert (Spur 2, 3, 6, 7, 8, 9). Ob die Caspase-1-Aktivierung bei NOD2-Defizienz Östrogen-abhängig ist, wird in Punkt 3.6.3 untersucht. Auch hier zeigen sich zwei schwache Banden nach LPS- und ATP-Stimulation bei 17 kDa in Spur 8 und 9. Das reife IL-1β wurde nicht komplett aus der Zelle geschleust. Die IL-1β-Reifung nach Doppelstimulation mit LPS und ATP scheint Caspase-1 unabhängig, da sich in den Spuren 8 und 9 keine aktivierte Caspase-1 nachweisen lässt.

ASC wird augenscheinlich konstitutiv exprimiert, unabhängig von der Ligandenstimulation und Konzentration. β-Actin wird als unabhängige Positivkontrolle mitgeführt.

3.6.2 Primäre Peritonealmakrophagen der männlichen WT^{-/-}-Maus, jedoch nicht der NOD2^{-/-}-Maus, zeigen TLR-und NLR-Synergie

Zur weiteren Untersuchung, ob das Verhalten der weiblichen Nod2^{-/-}-Zellen bezüglich der erhöhten IL-1β-Produktion auf das Hormon 17β-Östradiol zurückzuführen ist, wurde der gleiche Versuch mit männlichen murinen Peritonealmakrophagen durchgeführt. Die Zellen wurden mit 10 und 100 ng/ml LPS bzw. Pam₂Cys für 5h vorstimuliert und dann für weitere 19h mit 10 µg/ml MDP inkubiert.

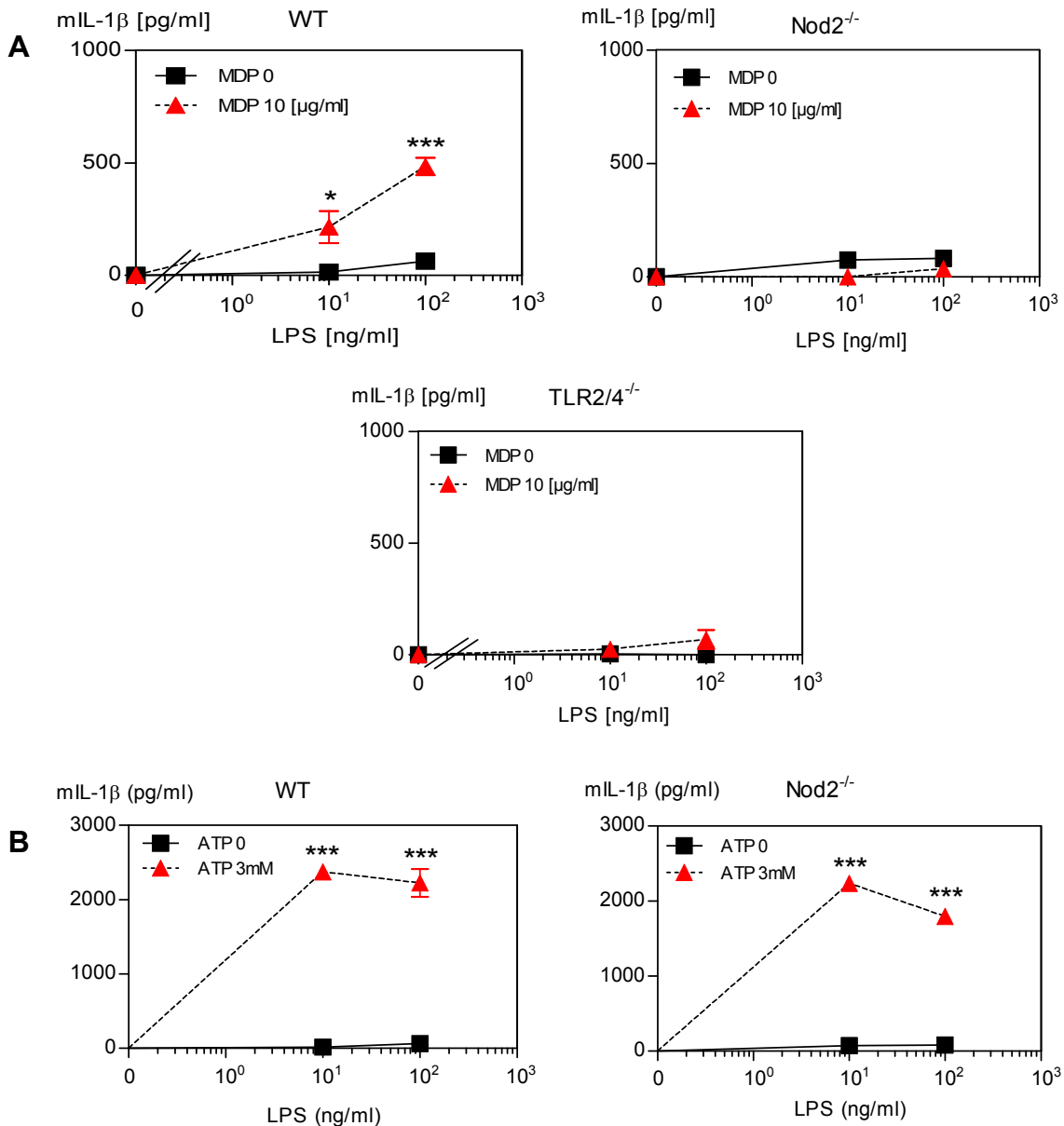


Abb. 32: Muriner IL-1β-ELISA von männlichen primären murinen Peritonealmakrophagen nach LPS- und MDP- bzw. ATP-Stimulation

Die Zellen wurden 5h stimuliert mit 10 und 100 ng/ml LPS und **A** 19h mit MDP 10.000 ng/ml und **B** 30 min. mit ATP 3mM. Nach 24h wurde IL-1β im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Das Experiment wurde mit einer Anzahl von n=3 gepoolten Mäusen für jeden Genotyp durchgeführt (Two-way ANOVA, *** p<0,0001; ** p<0,001; * p<0,05)

Männliche WT-Peritonealmakrophagen reagierten ähnlich wie die der weiblichen WT-Maus auf eine synergistische IL-1β-Produktion nach Doppelstimulation von TLR4 und Nod2 durch LPS und MDP. Die IL-1β-Ausschüttung erreichte einen Wert von ca. 500 pg/ml. Ohne den zweiten Stimulus von Nod2 durch MDP steigt die IL-1β-Produktion nur

bis ca. 70 pg/ml (Abb. 31). Die beiden Rezeptoren TLR4 und Nod2 arbeiten demnach in einer synergistischen Weise zusammen, um bei bakterieller Infektion vermehrt IL-1 β freizusetzen. Wenn der zytoplasmatische Rezeptor NOD2 fehlt, kann die Zelle nicht optimal mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 β reagieren. Die Zelle hat anscheinend keinen Ausweichmechanismus, um IL-1 β unabhängig von NOD2 und indirekt Caspase-1 in erhöhtem Maße zu produzieren.

3.6.2.1 Die TLR-und NLR-Synergie in primären männlichen WT-Peritonealmakrophagen zeigt keine Caspase-1-Abhängigkeit

Auch mit den männlichen Mausperitonealmakrophagen wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um zytoplasmatisch exprimierte Proteine zu untersuchen. Verglichen wurden ProCaspase-1, aktivierte Caspase-1, ProIL-1 β , reifes IL-1 β , und ASC.

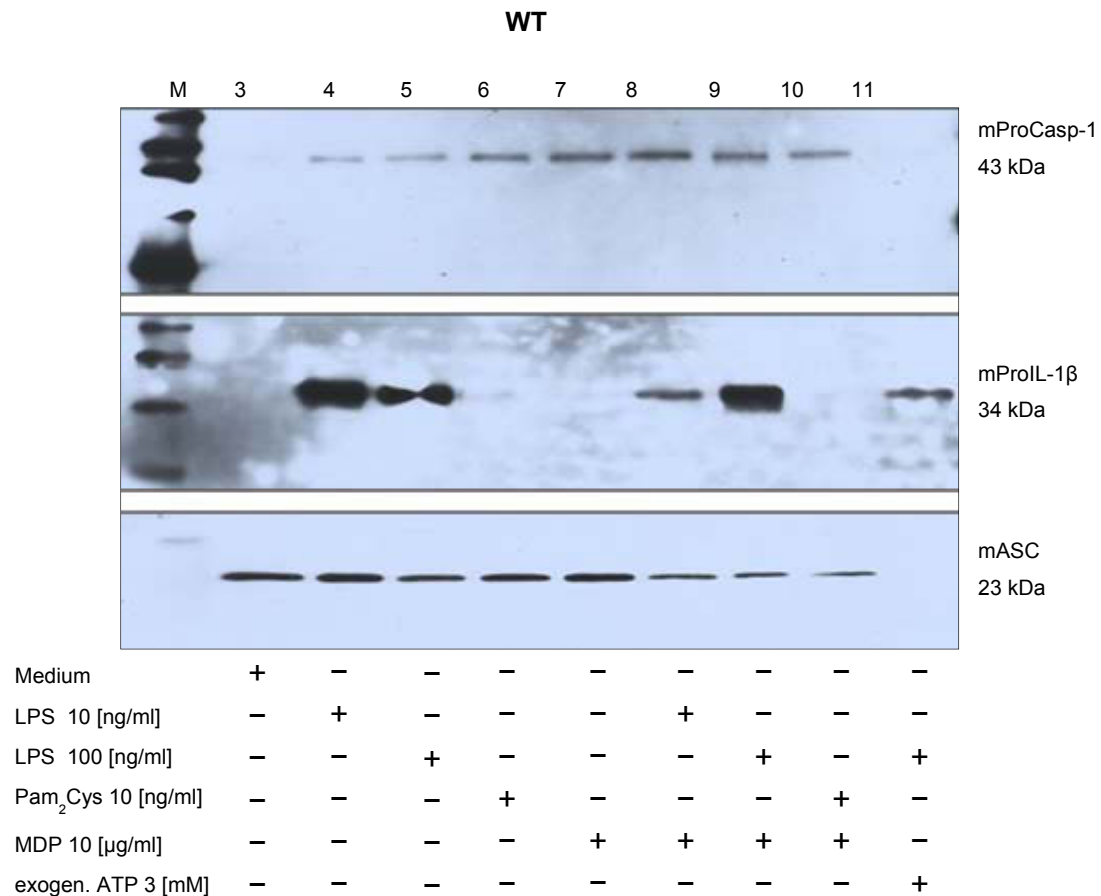


Abb. 33: WB von Caspase-1, IL-1 β und ASC aus Peritonealmakrophagen-Lysat der männlichen WT-Maus.

Stimulation mit LPS/Pam₂Cys und MDP bzw. ATP in verschiedenen Konzentrationen. Inkubation mit mCasp-1AK 1:500, mIL-1 β -AK 1:250, mASC-AK 1:500; Belichtungszeit: ÜN, 6 min, 10 min.

ProCasp-1 scheint konstitutiv exprimiert zu werden (Abb. 32). Obwohl bei der WT-Maus IL-1 β in hohem Maße im Überstand zu finden ist (500 pg/ml, Abb. 31), lässt sich im Western Blot keine aktive Caspase-1 (10 kDa) nachweisen, die proIL-1 β zu reifem IL-1 β geschnitten hätte. Dieser Umstand könnte ein Hinweis darauf sein, dass es dafür Ausweich-Mechanismen gibt. Womöglich gibt es alternative, endogene Proteasen, die proIL-1 β zu reifem IL-1 β schneiden. Auch exogen zugeführtes ATP führt nicht zu einer Caspase-1 Aktivierung (Spur 11). ProIL-1 β wird nur nach TLR-Aktivierung durch LPS oder Pam₂Cys exprimiert (Spur 4, 5 und 8, 9). ASC, Protein des Inflammasoms, wird konstitutiv exprimiert, jedoch nicht nach Stimulation mit ATP (Spur 11). Wie in Abb. 31 **B** zu sehen ist, führt die Stimulation mit LPS und ATP sowohl bei WT- als auch bei NOD2-defizienten Männchen zur synergistischen IL-1 β Sekretion (ca. 2000 pg/ml). Dieser Mechanismus

scheint Caspase-1 unabhängig zu sein, und demnach auch NOD2-unabhängig, da sich keine aktivierte Caspase-1 im Western Blot detektieren lässt.

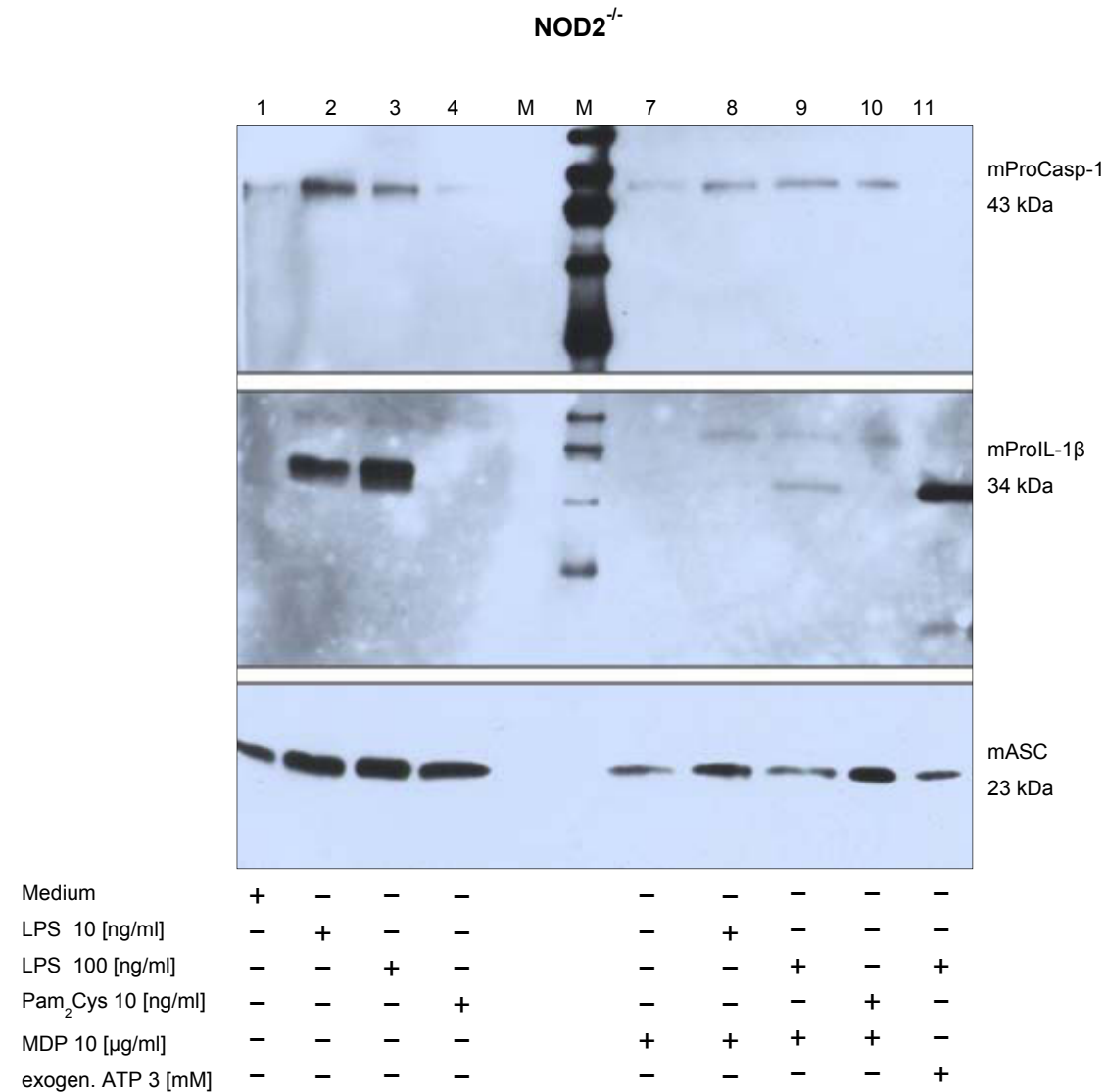


Abb. 34: WB von Caspase-1, IL-1β und ASC aus Peritonealmakrophagen-Lysat der männlichen NOD2^{-/-}-Maus.

Stimulation mit LPS/Pam₂Cys und MDP bzw. ATP in verschiedenen Konzentrationen. Inkubation mit mCasp-1AK 1:500, mIL-1β-AK 1:250, mASC-AK 1:500. M=Marker. Belichtungszeit: ÜN, 6 min, 10 min

Bei den Peritonealmakrophagen der NOD2-defizienten männlichen Mäuse lässt sich eine konstitutive proCaspae-1-Expression feststellen (Abb. 33). Wie aus den ELISA-Ergebnissen ersichtlich (Abb. 31A), wird hier kein reifes IL-1β in den Überstand sezerniert.

niert. Diese IL-1 β Reifung scheint NOD2-abhängig zu sein und ist vielleicht auch Caspase-1 abhängig, da im Western Blot keine aktivierte Caspase-1 (10 kDa) detektiert wurde.

Jedoch findet in WT- und NOD2-defizienten Makrophagen (Abb. 31B) eine erhöhte IL-1 β Sekretion statt, was darauf schliessen lässt, dass die IL-1 β -Reifung nach Stimulation mit LPS und ATP unabhängig von NOD2 und Caspase-1 passiert, da auch hier, nach Stimulation mit LPS und ATP keine aktivierte Caspase-1 im Western Blot nachzuweisen war. Es kann allerdings auch eine alternative IL-1 β -Prozessierung mit anderen Proteasen vorkommen, die hier womöglich zum Zuge kam. ProIL-1 β wird nur nach Stimulation mit LPS und ganz schwach mit Pam₂Cys durch NF- κ B-Aktivierung exprimiert. ASC erscheint als konstitutiv exprimiertes Protein im Western Blot.

3.6.3 IL-1 β -Ausschüttung in RAW 264.7-Zellen nach Ko-Stimulation von TLR4 und NOD2 unter Östrogen-Einfluss

Um zu überprüfen, warum sich die Ergebnisse der weiblichen und männlichen Nod2^{-/-}-Peritonealmakrophagen hinsichtlich der IL-1 β -Produktion so stark unterscheiden, wurde auf die Zelllinie RAW264.7 zurückgegriffen. Diese Zelllinie geht auf murine Peritonealmakrophagen zurück, die immortalisiert wurden. Die Zellen wurden über 24 h in 17 β -Östradiol (E2, Sigma) inkubiert, um so die weibliche Hormonsituation in der weiblichen Maus vereinfacht zu simulieren. Mit Hilfe des Nukleoporationssystems der Lonza AG konnte in den Nuclei der Zellen durch eingebrachte siRNA (Ambion) das Nod2-Gen ausgeschaltet werden. Daraufhin wurden diese Zellen mit bakteriellen Liganden (LPS und MDP) stimuliert, nach 24 h die Überstände gesammelt und mittels ELISA die IL-1 β -Konzentration bestimmt. Zum Vergleich wurden RAW264.7-Zellen ohne vorherige 17 β -Östradiol-Inkubation in gleicher Weise behandelt, um die IL-1 β -Konzentrationen zu vergleichen. Zur Kontrolle des Gen-*knock-downs* wurde eine RT-PCR durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

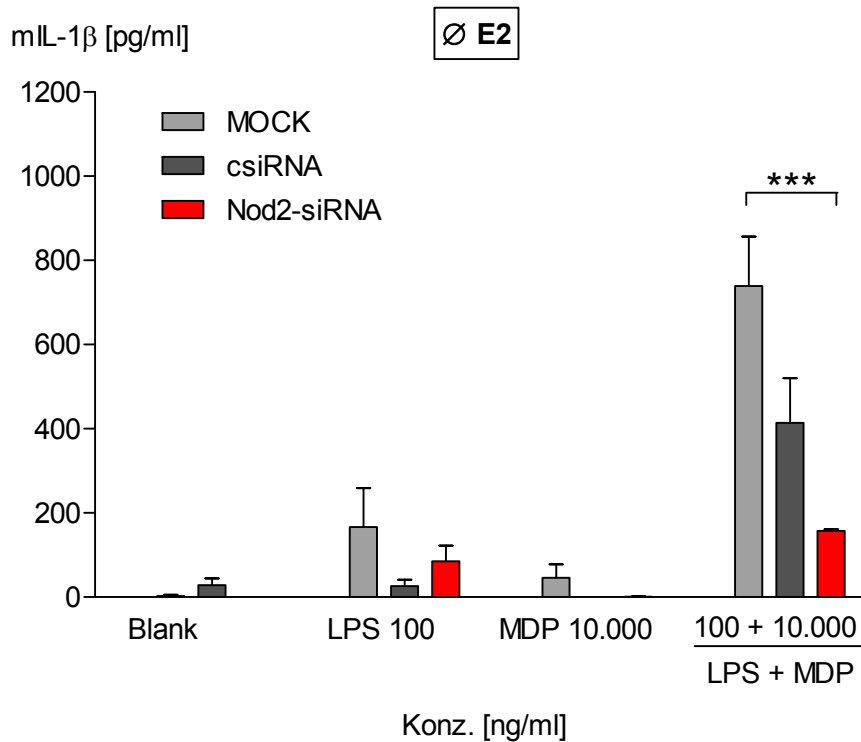


Abb. 35: Nod2-knock-down (24h) in RAW264.7-Zellen ohne E2

Stimuliert 6h mit 100 ng/ml LPS und 18h mit 10 mg/ml MDP, nach 24h IL-1 β -Messung mittels ELISA. MOCK = statt siRNA wurde Aqua dest. zugegeben, csiRNA = control siRNA (scrambled siRNA), Nod2-siRNA = Nod2-silencing RNA. Die Messwerte wurden aus drei gleichen Experimenten gemittelt (MW \pm SEM). *** p<0,0001 (two-way ANOVA)

Zellen wurden ohne 17 β -Östradiol-Vorinkubation direkt mittels Nukleoporation mit 3 μ g Nod2-siRNA transfiziert (Abb. 34). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 100 ng/ml LPS 0111:B4 vorstimuliert, dann das Medium gewechselt und nach weiteren 18 h mit 10 μ g/ml MDP stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 h abgenommen und bei -20°C gelagert. Im ELISA wurde IL-1 β quantifiziert. Die Negativkontrollen MOCK und csiRNA wiesen hohe IL-1 β -Konzentrationen auf, nachdem die Doppelstimulation erfolgte (700 bzw. 400 pg/ml). Hier ist die IL-1 β -Reifung ungestört, da TLR4 die Expression proIL-1 β triggern kann und NOD2 vermutlich die Aktivierung von Caspase-1. Sobald das Nod2-Gen jedoch durch Nod2-siRNA ausgeschaltet ist, kann proIL-1 β nicht mehr reifen, da anscheinend aktivierte Caspase-1 fehlt. Dieser Effekt ist hoch-signifikant (p<0,0001). So ähnlich muss die Situation in den männlichen Peritoneal-makrophagen gewesen sein, als WT- und Nod2^{-/-}-Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Liganden auf IL-1 β -Produktion hin untersucht wurden.

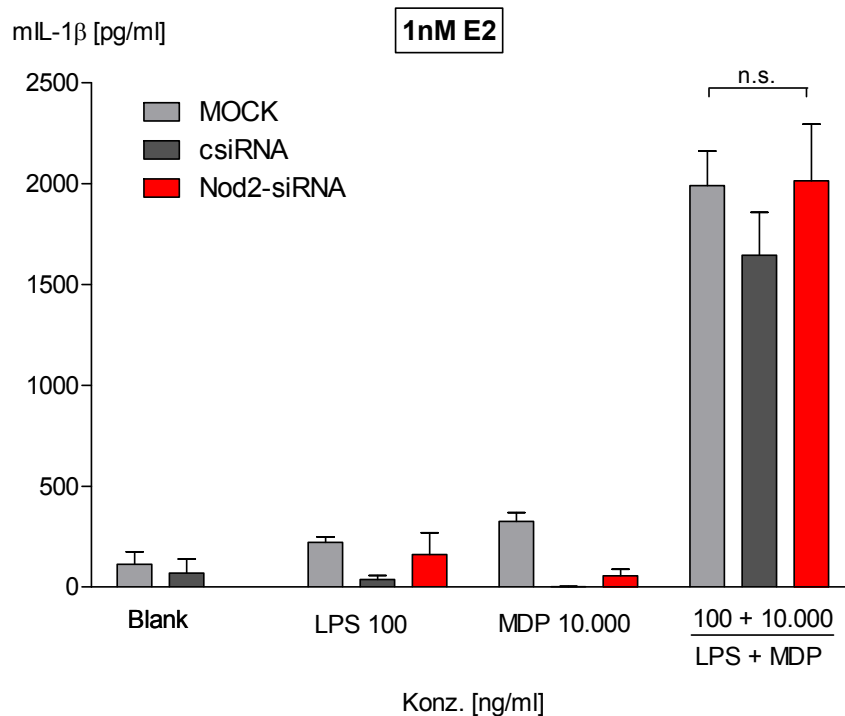


Abb. 36: Nod2-knock-down (24h) in RAW264.7-Zellen, vorinkubiert mit 1 nM E2

Stimuliert 6h mit 100 ng/ml LPS und 18h mit 10 mg/ml MDP, nach 24h IL-1 β Messung mittels ELISA. MOCK = statt siRNA wurde Aqua dest. zugegeben, csiRNA = control siRNA (scrambled siRNA), Nod2-siRNA = Nod2-silencing RNA. Die Messwerte wurden aus drei gleichen Experimenten gemittelt (MW \pm SEM). $p = \text{n.s.}$ (two-way ANOVA)

RAW264.7-Zellen wurden für 24 h in 17 β -Östradiol-haltigem komplettem RPMI-Medium kultiviert, bevor sie wie oben beschrieben transfiziert, stimuliert und im IL-1 β -ELISA analysiert wurden. In Abb. 35 wird gezeigt, dass die Negativkontrollen MOCK und csiRNA unter Östrogen-Einfluß nicht in ihrer Fähigkeit inhibiert sind auf bakterielle Stimulation mit LPS und MDP mit erhöhter IL-1 β -Freisetzung zu reagieren. Nach bakterieller Doppelstimulation von TLR4 und NOD2 wird in synergistischer Weise bis zu 2000 pg/ml IL-1 β freigesetzt. Zellen, deren Nod2-Gen durch Nod2-siRNA herunterreguliert wurden, reagieren ebenfalls mit einer starken synergistischen IL-1 β -Freisetzung, wenn man die Werte mit denen vergleicht, die nicht in 17 β -Östradiol inkubiert wurden (2000 pg/ml IL-1 β zu 200 pg/ml IL-1 β). Dies könnte die hormonelle Situation in der weiblichen Maus widerspiegeln, da diese erhöhten, zyklusabhängigen Östrogenwerten ausgesetzt. Eine Stimulation von TLR4 und NOD2 mit bakteriellen Liganden nach Inkubation in 1 nM 17 β -Östradiol und einer Herunterregulierung des Nod2-Gens führt demnach trotzdem zu einer erhöhten IL-1 β -Produktion.

Um herauszufinden, ob Caspase-1 durch das Östrogen aktiviert wird und es dadurch zu einer IL-1 β -Reifung kommen kann, wurde im nachfolgenden Versuch ein Caspase-1-Assay durchgeführt

3.7 Caspase-1 Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Caspase-1-Abhängigkeit bei der Doppelstimulation durch TLR4 und NOD2 und der erhöhten IL-1 β -Ausschüttung bei NOD2-defizienten weiblichen Mäusen, wurde ein Caspase-1-Aktivitätsassay in RAW264.7-Zellen durchgeführt. Dieser beruht auf der kolorimetrischen Umsetzung des Farbstoffes p-Nitroanilin und der daraufhin gemessenen Fluoreszenz, wenn Caspase-1 exprimiert wird. Bei RAW-Zellen wurde mittels siRNA ein Nod2-knockdown herbeigeführt und entweder ohne 17 β -Östradiol oder für 24 h in Medium mit 1 nM 17 β -Östradiol gehalten. Danach wurde für 6 h mit 100 ng/ml LPS und 18 h mit 10 μ M MDP stimuliert.

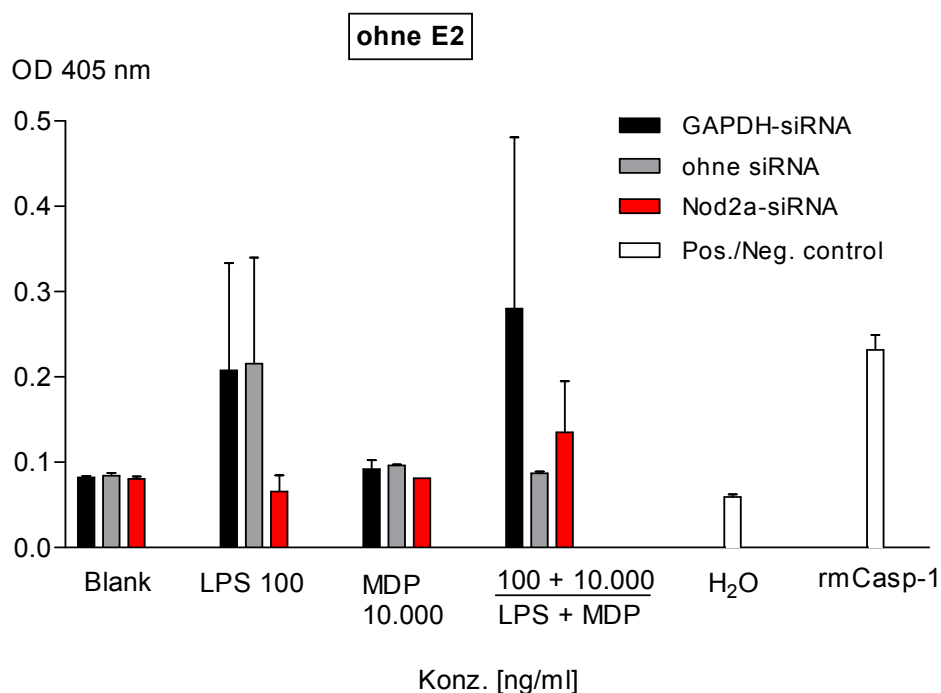


Abb. 37: Caspase-1-Assay von RAW264.7-Zellen mit Nod2-knock-down ohne E2.

Die Optische Dichte (OD) wurde bei 405 nm gemessen. GAPDH als Housekeeping-Gen und eine Probe ohne siRNA wurden zur Kontrolle mitgeführt. rmCasp-1=rekombinante murine Caspase-1

In Nod2-knock-down-Zellen ohne Östrogen-Inkubation wurde kaum Caspase-1 exprimiert, wenn mit LPS+MDP stimuliert wurde (Abb. 36). So wie in Abb. 34 gezeigt, reagieren

Nod2- *knock-down*-Zellen nicht auf den MDP-Stimulus, reifes IL-1 β wird kaum sezerniert. Diese Versuche simulieren die Situation in der männlichen Maus. Ohne den NOD2-Rezeptor ist keine MDP-getriggerte IL-1 β -Reifung möglich. Auch Caspase-1 scheint nicht aktiviert zu werden. Allerdings zeugen hohe Standardabweichungen von einer geringen Aussagekraft. Mangels Zeit konnte der Versuch nur einmal wiederholt werden.

In einem weiteren Versuch wurde die Situation in der weiblichen Maus simuliert, indem die Zellen primär in 1nM Östrogen vorinkubiert wurden. Daraufhin wurde der Nod2-*knock-down* durchgeführt, mit LPS und MDP stimuliert und der Caspase-1-Assay ausgeführt.

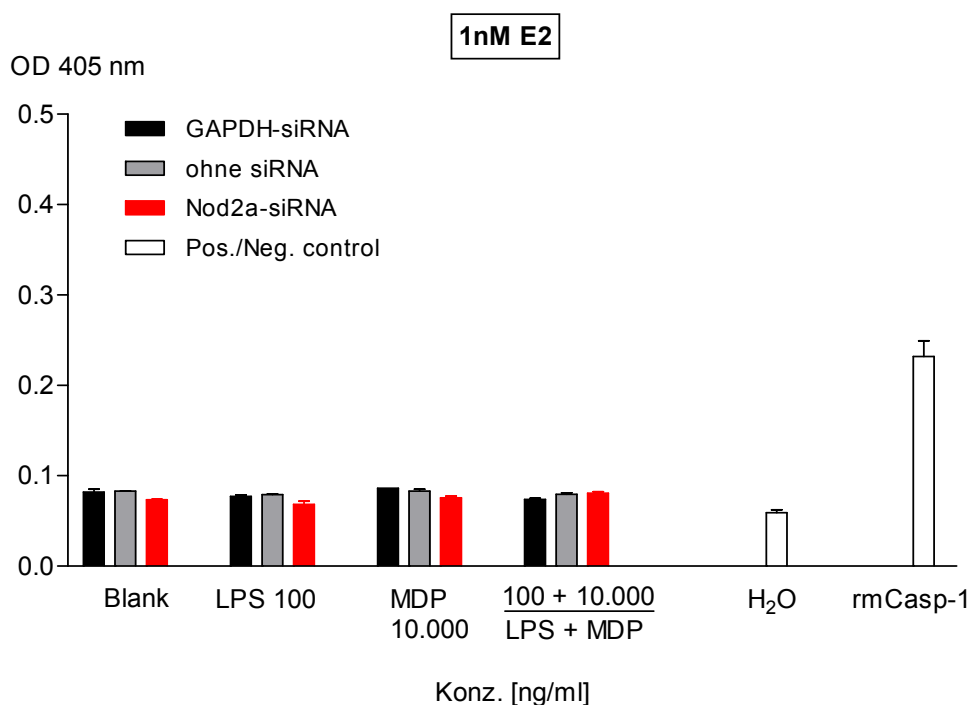


Abb. 38: Caspase-1-Assay von RAW264.7-Zellen mit Nod2-*knock-down*, vorinkubiert mit 1nM E2.

Die Optische Dichte (OD) wurde bei 405 nm gemessen. GAPDH als Housekeeping-Gen und eine Probe ohne siRNA wurden zur Kontrolle mitgeführt. rmCasp-1=rekombinante murine Caspase-1

Für diesen Versuch kann keine Aussage getroffen werden. Die Kontrollen und Proben liegen unter der OD von 0,1 nm und können nicht gewertet werden (Abb. 37). Die Positiv-Kontrolle rekombinante murine Caspase-1 liegt bei 0,3 nm; eine positive Probe sollte sich von der Negativ-Kontrolle (GAPDH, ohne siRNA, Aqua dest.) abheben. Zu erwarten wäre, dass in Östrogen inkubierte Nod2- *knock-down*-Zellen eine Caspase-1-Aktivierung zeigen.

Das ELISA-Ergebnis mit den hohen IL-1 β -Werten aus Abb. 35 deutet darauf hin. Darauf kann in einer weiterführenden Arbeit nochmals eingegangen werden, um festzustellen, ob Caspase-1 oder alternative Proteasen an der IL-1 β -Reifung beteiligt sind.

4 Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob eine Doppelstimulation von TLR und NLR durch bakterielle Liganden, wie z.B. LPS, Pam₂Cys, MDP zu einer synergistisch erhöhten IL-1 β -Antwort in Astrozyten und Mikroglia führt. Dafür wurden primäre murine Astrozyten und Mikroglia aus WT, NOD2^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-C56/Bl6-Mäusen isoliert, kultiviert und mit bakteriellen und synthetischen Liganden, die während einer Gram-positiven und Gram-negativen bakteriellen Meningitis das ZNS invadieren können, stimuliert. Die Liganden wurden für eine Stimulation des Immunsystems so kombiniert, dass die Toll-like Rezeptoren TLR2 bzw. TLR4 zu einer Immunantwort getriggert wurden und der Nod-like Rezeptor NOD2 bzw. das Inflammasom stimuliert wurde. Die Synergie der Rezeptoren äußerte sich in der Höhe der IL-1 β -Sekretion in den Überstand.

Im zweiten Teil wurde der Einfluss von Östrogen auf die angeborene Immunantwort bei primären murinen Peritonealmakrophagen während einer bakteriellen Infektion untersucht. Überraschenderweise wiesen die Ergebnisse auf unterschiedliche Immunantworten zwischen weiblichen und männlichen NOD2^{-/-}-Mäusen hin. Um die Ergebnisse der Primärversuche nachvollziehen zu können, wurde die RAW264.7-Zelllinie herangezogen, um per siRNA einen NOD2-*knock-down* herbeizuführen. Dann wurde mit synthetischem Östrogen der „weibliche“ Zustand simuliert und mit den bakteriellen Stimuli LPS und MDP bzw. exogenem ATP stimuliert. Als Read-out fungierte auch hier das Zytokin IL-1 β zur Überprüfung der Rezeptoren auf Synergie bei der IL-1 β -Ausschüttung.

4.1 Die Rolle der Astrozyten und Mikroglia bei der IL-1 β -Reifung während einer Infektion

4.1.1 Astrozyten

Die Zellen des Gehirns befinden sich in einem sterilen Milieu. Anders als Makrophagen, die im Körper ihre Umgebung nach Pathogenen absuchen und ständig mit bakteriellen Bestandteilen dieser Pathogene konfrontiert sind, sind Mikroglia und Astrozyten nicht konfrontiert. Benötigen sie dennoch den Doppelstimulus, um TLR und NLR zu aktivieren, um synergistisch IL-1 β zur Reifung zu bringen und um die Sekretion zu erhöhen?

Astrozyten besitzen TLRs und NLRs und sind somit in der Lage, IL-1 β zu produzieren. Eine gleichzeitige Stimulation von TLR4 und NOD2 durch LPS und MDP führt bei WT-Astrozyten zu einer signifikant synergistisch erhöhten IL-1 β -Antwort.

Bei Astrozyten wurde der Synergismus zwischen TLR4 und NOD2, der zu einer erhöhten IL-1 β -Ausschüttung führt, bestätigt. Dabei fördert TLR4 die Expression von proIL1 β , das jedoch keine Rolle bei der Caspase-1-Aktivierung spielt. Die TLR2/4^{-/-}-Astrozyten können nach Stimulation mit LPS bzw. Pam₂Cys kein proIL-1 β exprimieren, somit ist der NF- κ B-Signalweg unterbrochen. NOD2 hingegen hat in den Experimenten dieser Arbeit keinen Einfluss auf die proIL-1 β -Expression, der jedoch in vielen Publikationen angeführt wird, die den NOD2-RIP2-Komplex untersuchen [61], [199], [200]. Jedoch konnte ich eine eindeutige Rolle von NOD2 bei der Caspase-1-Aktivierung beobachten. Aktivierte Caspase-1 ist als Bande bei 10 kDa sichtbar (Abb. 21). Das heißt, und das wird auch bei den Astrozyten-Versuchen der WT-Mäuse sichtbar, dass NOD2 eine wichtige Funktion in der IL-1 β -Reifung einnimmt, wahrscheinlich durch die Caspase-1-Aktivierung. Möglich wäre es, da NOD2 über zwei CARD-Domänen verfügt und somit mit der CARD-Domäne von pro-Caspase-1 interagieren kann. Es wurde schon 2002 gezeigt, dass NOD1 an Caspase-1 durch CARD-CARD-Interaktion bindet [201]. Diese CARD-Domäne besitzt auch das NLRP3, das nachgewiesener Weise proCaspase-1 über ASC anregt (über ihre PYD-Domänen), sich autokatalytisch zu Caspase-1 zu aktivieren.

Die Rolle des Inflammasoms um NLRP3 und NLRP1 als Caspase-1-Aktivierer wurde schon durch viele Arbeitsgruppen [89], [202], [15] nachgewiesen, jedoch messen sie NOD2 dabei keine Rolle bei. Eine Ausnahme bildet die Arbeitsgruppe von Pan *et al.* [71]. Sie sehen einen Zusammenhang zwischen NOD2 und NLRP3 bei der Caspase-1-Aktivierung, zusammen mit RIP2 und ASC. Die Arbeitsgruppe um Hsu *et al.* entdeckte einen Zusammenhang zwischen NOD2 und NLRP1 des Inflammasoms als gemeinsame Caspase-1-Aktivierer, indem die CARD-Domäne von NOD2 mit der CARD-Domäne der Caspase-1 interagiert [72]. Bist *et al.* (2008) entdeckten die MDP-abhängige Caspase-1-Aktivierung via NLRP3, unabhängig von NOD2. Die Gruppe um Bruey *et al.* hält das NLRP2-Inflammasom in THP1-Makrophagen für den alleinigen Caspase-1-Aktivator [203].

Auch andere Gruppen fanden heraus, dass Caspase-1 nur durch das NLRP3-Inflammasom aktiviert wird, unabhängig von NOD2. Die Aktivierung erfolgte durch Toxine und Hämolyse der Bakterien *V. cholerae* [204], *H. pylori* [2], [205], *L. monocytogenes* [206] und *C. jejuni* [99] wenn im Versuch mit ganzen Bakterien stimuliert wird, ansonsten durch MDP [68], [69], Harnsäurekristalle [13], [207], [208], Aluminium Adjuvantien [209] und ATP [210], [211].

In der vorliegenden Dissertation hat NOD2, wahrscheinlich neben anderen Komponenten wie dem Inflammasom, zur Caspase-1-Aktivierung beigetragen, wie aus den Versuchen an postnatalen NOD2^{-/-}-Mäusen deutlich wurde. Bei Astrozyten von NOD2-defizienten Mäusen konnte kein reifes IL-1 β per ELISA nachgewiesen werden. Im Western Blot wurde proIL-1 β nur nach Stimulation mit LPS detektiert. Es konnte bei NOD2-defizienten Maus-Astrozyten auch keine aktivierte Caspase-1 (10 kDa) nach Doppelstimulation von TLR4 und NOD2 detektiert werden. Demnach scheint NOD2 bei der Caspase-1-Aktivierung in murinen Astrozyten ein essentieller Partner (vielleicht des Inflammasoms) zu sein. Es wäre denkbar, dass das Inflammasom (NLRP3, ASC, Caspase-1, etc) die Caspase-1-Aktivierung im Alleingang übernimmt, unabhängig von NOD2, wie bei Tschopp *et al.* (2004) gezeigt wurde [81]. Die Arbeitsgruppe um Kanneganti *et al.* (2006) konnte jedoch keinen Unterschied zwischen NLRP3^{-/-}- und WT-Mäusen finden, die mit MDP stimuliert wurden, daher vermuten sie eher bakterielle RNA als NLRP3-Aktivator [212]. Mariathasan *et al.* (2006) finden ebenfalls keinen Beweis, dass MDP NLRP3 aktivieren soll (eher Toxine und ATP) [15]. Claes *et al.* (2014) zeigten, dass ein Lipid A-modifizierter *Salmonella typhimurium*-Stamm eine starke Immunantwort in NOD2^{-/-}-Mäusen induzieren kann. Sie vermuten allerdings dass eine erhöhte TLR2 Stimulation zu den hohen IL-8-Werten beiträgt [213].

Die NOD2-Beteiligung amplifiziert also die TLR-Antwort. Diese Synergie in der IL-1 β -Produktion zwischen NOD2 und TLR2 bzw. TLR4 wird auf post-translationaler Ebene in einer Caspase-1-abhängigen Weise vermittelt. Deshalb könnte NOD2 als MDP-getriggelter Rezeptor tatsächlich zur Caspase-1-Aktivierung beitragen. Nicht als alleiniger Rezeptor aber in Kooperation mit dem Inflammasom.

ProIL-1 β wird in Astrozyten unter dem Einfluss von ATP zu reifem IL-1 β prozessiert und in großen Mengen sezerniert. Ob hierbei ATP durch Aktivierung des P₂X₇-Rezeptors eine Caspase-1-aktivierende Funktion übernimmt, wie in anderen Publikationen postuliert wird

[214], ist in meiner Arbeit nicht ersichtlich. Jedenfalls geschieht die proIL-1 β -Reifung unabhängig von NOD2, da in NOD2-defizienten Mäusen eine ebenso hohe IL-1 β -Sekretion (ca. 2000 pg/ml) stattfindet, wie in WT-Mäusen, im Gegensatz zur IL-1 β Reifung nach MDP-Stimulation. Raices *et al.* (2008) entdecken in humanen peripheren Blut-Monozyten (PBMCs), dass ein Priming mit LPS und die Zufuhr von exogenem ATP zu einer IL-1 β -Sekretion führt [215]. Dabei übernimmt das exogene ATP die Aktivierung von Caspase-1. Eine Studie der Gruppe van Well *et al.* (2013) assoziiert SNPs von TLR4 (+896 GG) und NOD2 (SNP8) mit einer erhöhten Suszeptibilität für Meningokokken-Meningitis in Kindern [216]. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass TLRs als membranständige Rezeptoren und NOD2 als zytosolischer Rezeptor in kooperativer Weise zur Bekämpfung von schweren Infektionskrankheiten, in diesem Fall der bakteriellen Meningitis, beitragen.

In meiner Arbeit konnte ich demnach zeigen, dass NOD2 nach MDP-Stimulation keinen Einfluss auf die proIL-1 β -Expression (s. Abb. 22) und die LPS+ATP-Antwort (s. Abb. 16) hat aber wahrscheinlich Einfluss auf die Caspase-1-Aktivierung in primären murinen Astrozyten nimmt.

4.1.2 Mikroglia

Mikroglia besitzen als residente Immunzellen des Gehirns eine ähnliche Ausstattung an Immunrezeptoren, u.a. TLRs und NLRs, wie periphere Makrophagen. In den Publikationen von Hanamsagar *et al.* (2011) und Boza-Serrano *et al.* (2014) wird über eine IL-1 β -Ausschüttung nach TLR- und NLRP3-Stimulation in Mikroglia berichtet [217], [218]. Eine gleichzeitige Stimulation von TLR4 und NOD2 durch LPS und MDP führte in WT-Mikrogliazellen in hiesiger Arbeit zu keiner synergistischen IL-1 β -Produktion. Der erste Stimulus von TLR4 bzw. TLR2 erfolgte durch LPS bzw. Pam₂Cys und es wurde über den NF- κ B-Signalweg proIL-1 β exprimiert, wie der Western Blot in Abb. 27 zeigt. Jedoch erfolgte keine IL-1 β -Reifung durch Caspase-1, es war nicht im Zytoplasma (Lysat) nachweisbar und es war kein IL-1 β im Überstand durch ELISA nachweisbar. Es gab also keine Caspase-1-Aktivierung, wie z.B. bei Astrozyten oder Makrophagen (RAW264.7 und primäre Peritonealmakrophagen). Wieso das gerade bei den primären postnatalen Mikroglia in dieser Arbeit geschah, bleibt spekulativ. Eine Gruppe um Facci *et al.* (2014) zeigt, dass primäre Mikroglia, u.a. isoliert aus Cortices der Ratte, eine hohe IL-1 β -Sekretion besitzen, nachdem mit LPS und ATP stimuliert wurde [219]. Dies konnte auch in meiner Arbeit bei

Mäusen nachgewiesen werden. Im ELISA wurden hohe IL-1 β -Werte nach LPS + ATP-Stimulation gemessen (ca. 1.500 pg/ml). Jedoch lässt sich im Western Blot keine aktivierte Caspase-1 nachweisen, weshalb angenommen werden kann, dass Caspase-1 nicht zur IL-1 β -Reifung beiträgt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Anwendung von isolierten Zellkulturen im Fall der primären Mikroglia zu einer verfälschten Vorführung der Tatsachen geführt haben könnte, da ein „Cross-talk“ zwischen den verschiedenen Gehirnzellen nicht möglich ist. Der Austausch von Signalmolekülen und Botenstoffen ist nicht gegeben, somit könnten die Mikrogliazellen trotz Doppelstimulation von TLR und NLR nicht adäquat reagiert haben und es konnte zu keiner IL-1 β -Reifung kommen. Andererseits wird in der Neurobiologie viel mit isolierten primären Mikrogliazellen experimentiert, die für den Moment des Experiments, d. h. ohne weitere Passage, sehr wohl mikrogliale Fähigkeiten exprimieren [220].

4.2 Östrogen-Einfluss auf murine Peritonealmakrophagen während einer Infektion

Das Geschlecht hat einen signifikanten Einfluss auf die Immunantwort während einer Infektion [186]. Das Hormon Testosteron hat einen anti-inflammatorischen Effekt auf das Immunsystem, indem es die Antikörperproduktion, die mRNA-Expression von induzierter Nitritoxid-Synthase (iNOS) sowie die Degranulation von Eosinophilen verringert, während Östrogen diese Funktionen verstärkt und damit pro-inflammatorisch wirkt [186]. Andererseits haben Männer eine verringerte Zell-vermittelte Immunantwort während einer Sepsis und somit eine schlechtere Prognose als Frauen, deren Östrogen während einer bakteriellen Sepsis protektiv wirkt [187]. Allgemein berichten McGowan *et al.* (1975) über eine signifikant erhöhte Inzidenz bakterieller Infektionen bei Männern als bei Frauen. Wichtig bei diesen Untersuchungen zu Geschlechtsunterschieden in der Immunantwort ist der Zeitpunkt der Erhebung in Bezug zum Östrogenzyklus bzw. Alter der Frau [188]. Frauen in der Menopause profitieren wahrscheinlich nicht mehr vom protektiven Effekt des Östrogens [187].

Die unterschiedlichen hormonellen Reaktionen auf das Immunsystem hängen auch stark vom eingewanderten Pathogen selbst ab. Nicht jede bakterielle oder virale Infektion resultiert in einer erhöhten Suszeptibilität des einen Geschlechts oder anderen Geschlechts [191]. *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) Bakteriämien kommen häufiger bei Männern als bei Frauen vor [192], [194].

Entgegengesetzt dazu berichtet die Gruppe um Laupland *et al.* (2008), dass *E.coli*-Bakteriämien mehrheitlich bei Frauen vorkommen. Kadioglu *et al.* (2011) untersuchte Geschlechtsunterschiede zur Suszeptibilität von *S. pneumoniae* bei Mäusen und kamen zu dem Ergebnis, dass männliche Mäuse eine höhere Bakterienlast in der Lunge, sowie höhere pro-inflammatorische Zytokinlevel und eine höhere Mortalitätsrate aufweisen als weibliche Mäuse [196]. Dieser Geschlechtsdimorphismus kommt auch vor, wenn das Immunsystem mit Komponenten des Bakteriums konfrontiert wird. Frauen besitzen ein höheres Risiko eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Eine Studie zeigt, dass Frauen eine im Durchschnitt 1,7 Mal höhere Anzahl an selbst-spezifischen T-Zellen aufweisen als Männer [221]. Die primären Peritonealmakrophagen der WT- und Nod2-defizienten Maus-Weibchen reagieren mit einer erhöhten IL-1 β Ausschüttung (800 pg/ml und 500 pg/ml), wenn mit 100 ng/ml LPS und 10 mg/ml MDP in Kombination stimuliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte bei NOD2-defizienten Männchen kaum IL-1 β nachgewiesen werden (< 50 pg/ml). Die WT-Zellen der männlichen Mäuse reagierten ähnlich wie die Zellen der weiblichen WT-zellen mit erhöhter IL-1 β -Ausschüttung (ca. 500 pg/ml).

Die Abwesenheit eines Gens durch knock-out hat laut Literatur zur Folge, dass das entsprechende Protein nicht gebildet werden kann und somit kein Nachweis stattfinden kann, ähnlich wie bei den NOD2-defizienten Peritonealmakrophagen der männlichen Mäuse. Die Peritonealmakrophagen der weiblichen Mäuse, denen NOD2 fehlt, können nach meinen Beobachtungen jedoch IL-1 β in beträchtlichem Maße, fast wie WT-Mäuse, herstellen. Saleh *et al.* (2006) fanden heraus, dass Caspase-12 die Caspase-1 Katalyse inhibiert [184]. In männlichen Mäusen wird Caspase-12 exprimiert und somit Caspase-1 inhibiert aber in weiblichen Mäusen wird Caspase-12 durch Östrogen inhibiert. Der Östrogenrezeptor ER α wird durch Östrogen aktiviert und transloziert in den Nukleus, wo es u.a. an der DNA an ein ER-Element (ERE) in Intron 7 des Gens bindet. In dieser Region befindet sich das *Casp-12*-Gen und wird dadurch inhibiert [185]. Somit kann Caspase-1 exprimiert werden und demzufolge IL-1 β . Dieser Östrogen-vermittelte Mechanismus der Caspase-12-Inhibition ist vermutlich evolviert, um die Frau z.B. während einer Schwangerschaft vor Infektionen zu schützen [185]. Vermutlich wird Caspase-1 in weiblichen murinen NOD2^{-/-} Peritonealmakrophagen meiner Arbeit unabhängig vom NOD2-Trigger durch MDP aktiviert. Die Publikation von Giannoni *et al.* (2011) kommt zu dem Schluss, dass NOD2 nicht durch Östrogen und somit ER α inhibiert wird, da NOD2 auf dem murinen Chromosom 8

liegt und somit keine Interaktion stattfinden kann [222]. Als möglichen alternativen Mechanismus zur IL-1 β -Prozessierung unabhängig von NOD2 sieht die Gruppe um Munding *et al.* (2006) das Protein EBBP (estrogen-responsive B box protein; TRIM16), das die IL-1 β -Aktivierung ersetzen kann, indem NLRP1 und Caspase-1 mit der RFP-Domäne (protein-binding domain) des EBBP interagieren [223]. Folgendes Szenario könnte bei weiblichen murinen Peritonealmakrophagen mit NOD2^{-/-} Genotyp auftreten:

Das endogen in der Maus vorkommende Östrogen supprimiert Caspase-12. Daraufhin kann Caspase-1 unabhängig von NOD2 z.B. durch NLRP3 via den äußeren Stimulus MDP aktiviert werden und proIL-1 β in die reife IL-1 β Form schneiden. Dieser NOD2-unabhängige Mechanismus kann vorkommen, um weiblichen Individuen trotzdem eine starke Immunantwort mitzugeben, falls NOD2 mutiert oder inaktiviert sein sollte. Somit besteht bei ihnen eine frühe, erhöhte Immunprotektion, das Pathogen kann schnell eliminiert werden. Auf lange Sicht jedoch kann dieser Zustand der „schnellen Verfügbarkeit“ von IL-1 β dauerhafte Entzündungen begünstigen, wie z. B. Crohn's Disease [224], einer kolorektalen Entzündung, die häufig bei NOD2-Mutierten auftritt [225], [226]. Bei den männlichen murinen Peritonealmakrophagen kommt diese NOD2-Unabhängigkeit nicht vor; wenn der NOD2-Rezeptor durch knock-out nicht funktioniert, kann auch keine Caspase-1 zur autokatalytischen Aktivität aktiviert werden. Das bedeutet, dass bei Männchen NOD2 und vermutlich das (NLRP3/NLRP1)-Inflammasom zusammenarbeiten müssen, um reifes IL-1 β zu generieren. In den Publikationen von Jeong *et al.* (2014) und Windheim *et al.* (2007) wird postuliert, dass die Stimulation von Neutrophilen bzw. humanen PBMCs durch MDP allein zu einer Expression von proIL-1 β durch Triggern des NOD2-RIP2-Komplexes und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt [227], [228]. Die Stimulation mit MDP allein führte in meinen Experimenten nicht zu einer Expression von proIL-1 β . Nur die Stimulation mit TLR-Liganden führt zu einer proIL-1 β Expression, wie aus den TLR2/4^{-/-}-Versuchen ersichtlich ist. Die Theorie über NF- κ B-Aktivierung durch NOD2 kann ich in meiner vorliegenden Arbeit nicht unterstützen.

Dass aber NOD2 eine Rolle auf der post-translationalen Ebene von proIL-1 β spielt, konnte ich beobachten. NOD2 hat, neben dem NLRP3-Inflammasom, auch eine proCaspase-1 aktivierende Funktion [73]. Sowohl NOD2, als auch NLRP3 besitzen CARD-Domänen, die mit der CARD-Domäne der proCaspase-1 interagieren können, und nicht nur mit der

CARD-Domäne von RIP2 [199]. Demnach besitzt NOD2 neben der postulierten NF- κ B-Aktivierungsfunktion auch, wie in meiner Arbeit vorgestellt, eine Caspase-1 aktivierende Funktion in primären murinen Astrozyten, in der humanen Astrozytenzelllinie U87-MG, in primären murinen Peritonealmakrophagen und in der murinen Peritonealmakrophagenzelllinie RAW267.4.

4.3 Mögliche Mechanismen zur IL-1 β -Regulierung

In verschiedenen Publikationen werden alternative Signalwege der IL-1 β -Reifung vorgestellt. Einen einheitlichen (einzigen) Mechanismus scheint es nicht zu geben, denn es ergeben sich Konstellationen – durch Mutationen, knock-out, Geschlecht – auf die die Zellen flexibel reagieren müssen. Deswegen sind an der IL-1 β -Regulation verschiedene Proteine beteiligt, um erstens eine strenge Regulation möglich zu machen, denn die ständige Verfügbarkeit von IL-1 β schädigt dauerhaft das Gewebe und zweitens, um bei Ausfall eines Proteins in der Signaltransduktion einen alternativen Weg einzuschalten.

Eindeutig wird ein erster Stimulus benötigt (LPS, Pam₂CSK), um eine TLR-vermittelte proIL-1 β -Expression durch NF- κ B zu erhalten. Der darauffolgende zweite Stimulus, der zur NLR-Aktivierung führt, ist im Falle dieser Arbeit MDP aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienzellwänden. Meine Ergebnisse deuten auf folgende beteiligte Proteine und stimmen mit folgenden Publikationen überein, die jedoch keine Astrozyten untersuchten:

1. LPS/P₂CSK + MDP: TLR2/4 + NOD2 + NLRP3 \rightarrow Caspase-1 \rightarrow IL-1 β
[229], [71]
2. LPS/P₂CSK + MDP: TLR2/4 + NOD2 + NLRP1/NLRP3 \rightarrow Caspase-1 \rightarrow IL-1 β
[102], [70], [72], [230]
3. LPS/P₂CSK + ATP: TLR2/4 + NOD2^{-/-} (+ NLRP3) \rightarrow Casp-1 \rightarrow IL-1 β
[231]
4. LPS/P₂CSK + ATP: TLR2/4 + NOD2^{-/-} \rightarrow Casp-1 \rightarrow IL-1 β
[232], [233]

**5. Östrogen + LPS/P₂CSK + MDP: TLR2/4 + ~~NOD2~~ EBBP oder NLRP3 → Casp-1
→ IL-1 β**

[223]

Die Vorläufer-Form von IL-1 β wird in murinen und humanen Astrozyten definitiv unter Beteiligung von NOD2 und Caspase-1 post-translational zu aktivem IL-1 β prozessiert. Ob das Inflammasom beteiligt ist, lässt sich den Ergebnissen nach nicht aussagen, ist jedoch höchstwahrscheinlich, da sich die Rezeptoren NOD2, NLRP1 und NLRP3 vom gleichen Stimulus MDP triggern lassen (s. **1.** und **2.**). NOD2 ist definitiv nicht mit TLR und RIP2 an der proIL-1 β -Expression beteiligt. Somit tragen die Rezeptoren TLR2 bzw. TLR4 und NOD2 in synergistischer Weise zur erhöhten IL-1 β -Ausschüttung bei. Stimulation mit LPS und ATP führt in murinen Astrozyten ebenfalls zu einer synergistisch erhöhten IL-1 β Sekretion jedoch unabhängig von NOD2, wie aus den NOD2^{-/-}-Versuchen hervorgeht. Ob NLRP3 als ATP-abhängiger Rezeptor an der Caspase-1-Aktivierung beteiligt ist, lässt sich in dieser Arbeit nicht aussagen (**3.**). Nach LPS- bzw. Pam₂Cys- und ATP-Stimulation kann bei Astrozyten, Mikroglia und Peritonealmakrophagen ein NOD2- bzw. Inflammasom- und Caspase-1-unabhängiger Weg zur proIL-1 β -Prozessierung vermutlich durch alternative Proteasen eingeschaltet werden (**4.**).

In murinen Peritonealmakrophagen scheint Östrogen einen protektiven Effekt auf den NOD2-defizienten Organismus zu haben, wenn mit den bakteriellen Zellwandbestandteilen LPS und MDP stimuliert wurde. Die pro-inflammatorische Immunantwort in Form eines synergistisch erhöhten IL-1 β -Anstiegs war bei weiblichen NOD2^{-/-}-Mäusen und auch bei siRNA- transfizierten RAW-Zellen mit NOD2-knock-down vorhanden und sichert so die Eliminierung des Pathogens. Inwieweit eine alternative Caspase-1-Aktivierung stattfand, z.B. durch EBBP, NLRP3 oder in Umgehung der Rezeptoren nur durch Caspase-12-Inhibition, bleibt zu spekulieren (**5.**). NOD2^{-/-}-Männchen zeigten keinen synergistischen IL-1 β -Anstieg, was bedeutet, dass kein alternativer Caspase-1-Aktivierungsweg angestoßen wurde. Der molekulare Mechanismus der streng regulierten IL-1 β -Regulation ist in Zellen des ZNS noch nicht vollständig aufgeklärt. Es bleiben Fragen zur Caspase-1-Aktivierung, der Inflammasom-Aktivierung durch Pannexin-1 und P₂X₇ und der Beteiligung von NOD2 am Inflammasom-Komplex.

4.4 Vergleich der Caspase-1-Aktivierung zwischen WT-Astrozyten und WT-Peritonealmakrophagen

Isolierte primäre WT-Astrozyten zeigen in den Western Blot-Versuchen eine 10 kDa-Bande, die aktivierte Caspase-1. Es ist anzunehmen, dass sich ProCaspase-1 durch den NOD2-Stimulus durch MDP autokatalytisch aktivieren konnte und so proIL-1 β zum reifen IL-1 β -Zytokin schneiden kann. Da in den NOD2^{-/-}-Astrozyten keine aktivierte Caspase-1 detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass NOD2 zur Caspase-1-Aktivierung beiträgt. In den isolierten primären weiblichen und männlichen WT-Peritonealmakrophagen (anders als bei der RAW264.7-Zelllinie) ist keine aktivierte Caspase-1 nachweisbar. Es bleibt spekulativ, ob dies am Handling und dem experimentellen Design liegt oder der Umgehung der Caspase-1-Aktivierung in den Zellen. Laut Publikation sind primäre Makrophagen zur Caspase-1-Aktivierung nach Stimulation fähig [234]. Trotz wiederholter Versuche ist es nicht gelungen, Caspase-1 nachzuweisen. Umso erstaunlicher ist der Caspase-1-Nachweis in weiblichen NOD2^{-/-}-Zellen, der bei Stimulation mit LPS + MDP auftritt (Abb. 29). Dieser Umstand wird unter 4.2 diskutiert.

4.5 Methodenkritik dieser Arbeit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots zur Caspase-1 Detektion waren schwer zu reproduzieren. Der verwendete Antikörper von Santa Cruz Biotechnologies war in der Lage, laut Hersteller, in einem SDS-PAGE-Gel die Precursor-Form von Caspase-1 bei 45 kDa und die aktivierte Caspase-1 bei 10 kDa zu detektieren. Dies erwies sich als unzuverlässig, da Caspase-1 einerseits bei primären murinen WT-Astrozyten detektiert werden konnte jedoch nicht bei primären murinen WT-Peritonealmakrophagen. Ein weiterer Antikörper von Santa Cruz, der aktivierte Caspase-1 als 20 kDa Bande detektieren sollte, wurde nicht verwendet, da keine Bande sichtbar wurde, weder bei WT-Astrozyten, RAW-Zellen oder primären Peritonealmakrophagen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der Präparation glialer Zellen aus dem postnatalen Gehirn der Maus müssen einige Schritte mit größter Sorgfalt durchgeführt werden. Es muss eine sterile Umgebung während des gesamten Experiments gegeben sein, es müssen alle Meningen (inkl. Leptomeningen) während der Mikrodissektion entfernt werden, da diese Endothelzellen und meningeale Makrophagen enthalten und die Ko-Kultur von Mikroglia und Astrozyten stören könnten. Eine Kontamination der Kultur muss vermieden werden, da Mikroglia als resi-

dente Immunzellen des ZNS auf exogen zugeführte Stimuli reagieren und ihre ramifizierte, ruhende Morphologie verlieren. Stimulierte Mikroglia sind also unbedingt zu vermeiden. Ein Vorteil dieser Co-Kultur ist jedoch das gemeinsame heranreifen von Mikroglia und Astrozyten vor der Zellisolation, damit Zell-Zell-Interaktionen ablaufen können. Die oben genannten Voraussetzungen waren jederzeit durch die Experimentatorin gegeben. Der Vorteil primär gewonnener Zellkulturen gegenüber immortalisierten Zelllinien ist das intakte Milieu, aus der Zellen gewonnen werden, z.B. des Gehirngewebes. Primärzellen eignen sich daher besser zur Darstellung der in-vivo-Situation eines Organismus. Bei der Übertragung der Daten von der Maus auf den Menschen kann man nur von einem Trend sprechen, da sich diese beiden Organismen zum Teil sehr unterscheiden.

5 Ausblick

Infektionskrankheiten wie z.B. bakterielle Meningitis führen zu einer Aktivierung des Immunsystems, um das Pathogen schnellstmöglich zu eliminieren. Ein Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine ist in der frühen Krankheitsphase unerlässlich, u.a. verursacht der Anstieg von IL-1 β Hyperthermie. Aufgrund des Platzmangels im Gehirn sollte diese Reaktion schnell nachlassen, um Folgeschäden zu vermeiden. Bei Autoimmunerkrankungen ist eine überschießende Immunantwort des Organismus, u.a. verursacht durch Polymorphismen in Genen des angeborenen Immunsystems, verantwortlich für die Entstehung der Krankheit.

Bekannte Polymorphismen im *Nod2*-Gen führen zu Autoimmunerkrankungen wie Blau Syndrom (juvenile systemic granulomatous disease, in Kombination mit Dermatitis und Uveitis) [235] und Morbus Crohn (CD) [57]. Im *Nlrp3*-Gen führen gain-of-function Mutationen zu Autoimmunerkrankungen wie z. B. Muckle-Wells-Syndrom (MWS) [236], familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS) [237], neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID) bzw. chronic infantile neurologic, cutaneous, articular (CINCA) syndrome [83], [84] und Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS). Diese Krankheiten führen hauptsächlich zu exzessiver Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, unter anderem IL-1 β .

Eine therapeutische Strategie zur Blockade der IL-1 β -Aktivität wäre wünschenswert, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Auch im Falle der bakteriellen Meningitis wäre eine rasche Senkung der IL-1 β -Level sinnvoll, um Folgeschäden im Gehirn zu vermeiden, die durch anhaltende Hyperthermie (Hirnschwellung und Ödeme) verursacht werden. Momentan gibt es drei neutralisierende Antikörper, die in der Therapie Anwendung finden. Anakinra ist die rekombinante Form des IL-1-Rezeptorantagonisten. Es bindet an den IL-1-Rezeptor und verhindert die Bindung von IL-1 β und IL-1 α . Rilonacept ist ein löslicher Fusionsrezeptor, der IL-1 β und IL-1 α inhibiert. Canakinumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der nur IL-1 β blockiert [238]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz wäre die Inhibition der Protease Caspase-1, die zur IL-1 β -Reifung beiträgt. Wie Randle *et al.* schon 2001 festgestellt haben, kann der Caspase-1-Inhibitor Pralnacasan IL-1 β -Level in der rheumatoiden Arthritis senken [239], [240]. Auch Belnacasan, ein weiterer Caspase-1-Inhibitor, findet in der anti-inflammatorischen Therapie Verwendung, indem es

IL-1 β während epileptischer Anfälle senkt [241] und auch in der HIV-Therapie zum Einsatz kommt [242]. Jedoch muss die Nutzen-Risiko-Balance beachtet werden, da die Gabe von Immunsuppressiva kritisch zu betrachten ist, weil die Unterdrückung eines Teils des Immunsystems zu weiteren schweren Infektionen mit Bakterien, Viren oder Pilzen führen kann.

Im Bereich der Geschlechterforschung in der Medizin gibt es noch viel Nachholbedarf. Bisherige Forschung konzentrierte sich auf zwei Disziplinen: die Endokrinologie, vor allem der Effekt von Steroidhormonen und die Genetik, vor allem der Effekt des X-Chromosoms. Seitdem bekannt ist, dass Steroidhormone einen signifikanten Einfluss auf die Immunantwort nehmen, kann gezielte auf die verschiedenen Geschlechter im Rahmen einer geschlechterbasierten Therapie eingegangen werden. Da Frauen ein größeres Risiko besitzen, eine Autoimmunerkrankung wie z.B. Morbus Crohn durch Nod2-Mutation zu entwickeln, kommen hier die IL-1 β - und Caspase-1-Inhibitoren zu Gute.

Literaturverzeichnis

- [1] Janeway, C. A., Jr. (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 3: 1167-1171.
- [2] Littman, D. R. (1989) Role of cell-to-cell interactions in T lymphocyte development and activation. *Current opinion in cell biology*. 1: 920-928.
- [3] Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381: 751-758.
- [4] Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)*. 296: 298-300.
- [5] Akira, S. (2006) TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology*. 311: 1-16.
- [6] Janeway, C. A. (1989) Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature*. 341: 108.
- [7] Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*. 9: 4-9.
- [8] Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 440: 237-241.
- [9] Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore, and D. T. Golenbock (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology*. 9: 857-865.
- [10] Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack, and V. M. Dixit (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 440: 228-232.
- [11] Ayna, G., D. V. Krysko, A. Kaczmarek, G. Petrovski, P. Vandenabeele, and L. Fesus (2012) ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PloS one*. 7: e40069.
- [12] Nusslein-Volhard, C., and E. Wieschaus (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287: 795-801.

- [13] Anderson, K. V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 42: 779-789.
- [14] Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983.
- [15] Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388: 394-397.
- [16] Kirschning, C. J., and S. Bauer (2001) Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 291: 251-260.
- [17] Kopp, E. B., and R. Medzhitov (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current opinion in immunology*. 11: 13-18.
- [18] Koblansky, A. A., D. Jankovic, H. Oh, S. Hieny, W. Sungnak, R. Mathur, M. S. Hayden, S. Akira, A. Sher, and S. Ghosh (2013) Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 38: 119-130.
- [19] Oldenburg, M., A. Kruger, R. Ferstl, A. Kaufmann, G. Nees, A. Sigmund, B. Bathke, H. Lauterbach, M. Suter, S. Dreher, U. Koedel, S. Akira, T. Kawai, J. Buer, H. Wagner, S. Bauer, H. Hochrein, and C. J. Kirschning (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science (New York, N.Y.)*. 337: 1111-1115.
- [20] Kawai, T., and S. Akira (2006) TLR signaling. *Cell death and differentiation*. 13: 816-825.
- [21] Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 169: 6668-6672.
- [22] Bell, J. K., I. Botos, P. R. Hall, J. Askins, J. Shiloach, D. M. Segal, and D. R. Davies (2005) The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding

- p>domain.
- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
- . 102: 10976-10980.
- [23] Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 130: 1071-1082.
- [24] Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, N.Y.)*. 285: 736-739.
- [25] Jang, T. H., and H. H. Park (2014) Crystal structure of TIR domain of TLR6 reveals novel dimeric interface of TIR-TIR interaction for toll-like receptor signaling pathway. *Journal of molecular biology*. 426: 3305-3313.
- [26] Buwitt-Beckmann, U., H. Heine, K. H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, and A. J. Ulmer (2005) Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *The FEBS journal*. 272: 6354-6364.
- [27] Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*. 282: 2085-2088.
- [28] Kang, J. Y., X. Nan, M. S. Jin, S. J. Youn, Y. H. Ryu, S. Mah, S. H. Han, H. Lee, S. G. Paik, J. O. Lee (2009) Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 31: 873-884.
- [29] Ohto, U., K. Fukase, K. Miyake, and T. Shimizu (2012) Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 7421-7426.
- [30] Kim, H. M., B. S. Park, J. I. Kim, S. E. Kim, J. Lee, S. C. Oh, P. Enkhbayar, N. Matsushima, H. Lee, O. J. Yoo, and J. O. Lee (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 130: 906-917.
- [31] Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)*. 249: 1429-1431.

- [32] Eckert, J. K., Y. J. Kim, J. I. Kim, K. Gurtler, D. Y. Oh, S. Sur, L. Lundvall, L. Hamann, A. van der Ploeg, P. Pickkers, E. Giamarellos-Bourboulis, A. V. Kubarenko, A. N. Weber, M. Kabesch, O. Kumpf, H. J. An, J. O. Lee, and R. R. Schumann (2013) The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*. 39: 647-660.
- [33] Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 171: 4304-4310.
- [34] Lin, S. C., Y. C. Lo, and H. Wu (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 465: 885-890.
- [35] Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell*. 2: 253-258.
- [36] Kawasaki, T., and T. Kawai (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 5: 461.
- [37] Li, N., and M. Karin (2000) Signaling pathways leading to nuclear factor-kappa B activation. *Methods in enzymology*. 319: 273-279.
- [38] Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine*. 198: 1043-1055.
- [39] Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science (New York, N.Y.)*. 300: 1148-1151.
- [40] Rhee, S. H. (2014) Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. *Intestinal research*. 12: 90-95.
- [41] Inohara, N., and G. Nunez (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews. Immunology*. 3: 371-382.

- [42] Ting, J. P., and B. K. Davis (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annual review of immunology*. 23: 387-414.
- [43] Kobayashi, K. S., E. E. Eynon, and R. A. Flavell (2003) Intracellular debugging. *Nature immunology*. 4: 652-654.
- [44] Leister, D. (2004) Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene. *Trends in genetics : TIG*. 20: 116-122.
- [45] Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, N.Y.)*. 300: 1584-1587.
- [46] Bertin, J., and P. S. DiStefano (2000) The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell death and differentiation*. 7: 1273-1274.
- [47] Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and J. C. Reed (1998) A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *The Journal of biological chemistry*. 273: 7787-7790.
- [48] Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nunez (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual review of biochemistry*. 74: 355-383.
- [49] Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 442: 39-44.
- [50] Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, and G. Nunez (2007) Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 27: 549-559.
- [51] Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, and G. Nunez (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry*. 278: 5509-5512.
- [52] Girardin, S. E., L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreulx (2003) Peptidoglycan molecular

- p>requirements allowing detection by Nod1 and Nod2.
- The Journal of biological chemistry*
- . 278: 41702-41708.
- [53] Bertin J., W. J. Nir, C. M. Fischer, O. V. Tayber, P. R. Errada, J. R. Grant, J. J. Keilty, M. L. Gosselin, K. E. Robinson, G. H. Wong, M. A. Glucksmann and P. S. DiStefano (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 274: 12955-12958.
- [54] Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 276: 4812-4818.
- [55] Caruso, R., N. Warner, N. Inohara, and G. Nunez (2014) NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity*. 41: 898-908.
- [56] Magalhaes, J. G., J. Lee, K. Geddes, S. Rubino, D. J. Philpott, and S. E. Girardin (2011) Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *European journal of immunology*. 41: 1445-1455.
- [57] Shimada, K., S. Chen, P. W. Dempsey, R. Sorrentino, R. Alsabeh, A. V. Slepentin, E. Peterson, T. M. Doherty, D. Underhill, T. R. Crother, and M. Arditi (2009) The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomphila pneumoniae* lung infection. *PLoS pathogens*. 5: e1000379.
- [58] Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov, and R. A. Flavell (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*. 416: 194-199.
- [59] Sabbah, A., T. H. Chang, R. Harnack, V. Frohlich, K. Tominaga, P. H. Dube, Y. Xiang, and S. Bose (2009) Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature immunology*. 10: 1073-1080.
- [60] Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 27: 229-265.
- [61] Bryant, C., and K. A. Fitzgerald (2009) Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in cell biology*. 19: 455-464.
- [62] Molineaux, S. M., F. J. Casano, A. M. Rolando, E. P. Peterson, G. Limjuco, J. Chin, P. R. Griffin, J. R. Calaycay, G. J. Ding, T. T. Yamin, and *et al.* (1993)

- Interleukin 1 beta (IL-1 beta) processing in murine macrophages requires a structurally conserved homologue of human IL-1 beta converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 1809-1813.
- [63] Thornberry, N. A. (1997) The caspase family of cysteine proteases. *British medical bulletin*. 53: 478-490.
- [64] Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 10: 417-426.
- [65] Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan, and J. Tschopp (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current biology : CB*. 14: 1929-1934.
- [66] Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y. G. Kim, D. Miller, C. McDonald, G. J. Boons, and G. Nunez (2008) Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 180: 4050-4057.
- [67] Hedl, M., and C. Abraham (2013) NLRP1 and NLRP3 inflammasomes are essential for distinct outcomes of decreased cytokines but enhanced bacterial killing upon chronic Nod2 stimulation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 304: G583-596.
- [68] Pan, Q., J. Mathison, C. Fearn, V. V. Kravchenko, J. Da Silva Correia, H. M. Hoffman, K. S. Kobayashi, J. Bertin, E. P. Grant, A. J. Coyle, F. S. Sutterwala, Y. Ogura, R. A. Flavell, and R. J. Ulevitch (2007) MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *Journal of leukocyte biology*. 82: 177-183.
- [69] Hsu, L. C., S. R. Ali, S. McGillivray, P. H. Tseng, S. Mariathasan, E. W. Humke, L. Eckmann, J. J. Powell, V. Nizet, V. M. Dixit, and M. Karin (2008) A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 7803-7808.
- [70] Ferwerda, G., M. Kramer, D. de Jong, A. Piccini, L. A. Joosten, I. Devesaginer, S. E. Girardin, G. J. Adema, J. W. van der Meer, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, and M.

- G. Netea (2008) Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1 β mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1 β . *European journal of immunology*. 38: 184-191.
- [71] Bonen, D. K., Y. Ogura, D. L. Nicolae, N. Inohara, L. Saab, T. Tanabe, F. F. Chen, S. J. Foster, R. H. Duerr, S. R. Brant, J. H. Cho, and G. Nunez (2003) Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 124: 140-146.
- [72] Sterka, D., Jr., and I. Marriott (2006) Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *Journal of neuroimmunology*. 179: 65-75.
- [73] Sterka, D., Jr., D. M. Rati, and I. Marriott (2006) Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia*. 53: 322-330.
- [74] Liu, X., V. S. Chauhan, A. B. Young, and I. Marriott (2010) NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia*. 58: 839-847.
- [75] Chauhan, V. S., D. G. Sterka, Jr., D. L. Gray, K. L. Bost, and I. Marriott (2008) Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 180: 8241-8249.
- [76] Chauhan, V. S., D. G. Sterka, Jr., S. R. Furr, A. B. Young, and I. Marriott (2009) NOD2 plays an important role in the inflammatory responses of microglia and astrocytes to bacterial CNS pathogens. *Glia*. 57: 414-423.
- [77] Zwerina, J., K. Redlich, K. Polzer, L. Joosten, G. Kronke, J. Distler, A. Hess, N. Pundt, T. Pap, O. Hoffmann, J. Gasser, C. Scheinecker, J. S. Smolen, W. van den Berg, and G. Schett (2007) TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 11742-11747.
- [78] Martinon, F., and J. Tschopp (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*. 117: 561-574.
- [79] Rieber, N., A. Gavrilov, L. Hofer, A. Singh, H. Oz, T. Endres, I. Schafer, R. Handgretinger, D. Hartl, and J. Kuemmerle-Deschner (2015) A functional

- inflammasome activation assay differentiates patients with pathogenic NLRP3 mutations and symptomatic patients with low penetrance variants. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 157: 56-64.
- [80] Prieur, A. M. (2001) A recently recognised chronic inflammatory disease of early onset characterised by the triad of rash, central nervous system involvement and arthropathy. *Clinical and experimental rheumatology*. 19: 103-106.
- [81] Neven, B., I. Callebaut, A. M. Prieur, J. Feldmann, C. Bodemer, L. Lepore, B. Derfalvi, S. Benjaponpitak, R. Vesely, M. J. Sauvain, S. Oertle, R. Allen, G. Morgan, A. Borkhardt, C. Hill, J. Gardner-Medwin, A. Fischer, and G. de Saint Basile (2004) Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood*. 103: 2809-2815.
- [82] Dinarello, C. A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 87: 2095-2147.
- [83] Dinarello, C. A. (1997) Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews*. 8: 253-265.
- [84] Martinon, F., O. Gaide, V. Petrilli, A. Mayor, and J. Tschopp (2007) NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Seminars in immunopathology*. 29: 213-229.
- [85] Martinon, F., K. Hofmann, and J. Tschopp (2001) The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Current biology : CB*. 11: R118-120.
- [86] Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4: 95-104.
- [87] Faustin, B., L. Lartigue, J. M. Bruey, F. Luciano, E. Sergienko, B. Bailly-Maitre, N. Volkmann, D. Hanein, I. Rouiller, and J. C. Reed (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell*. 25: 713-724.
- [88] Rubartelli, A., F. Cozzolino, M. Talio, and R. Sitia (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal*. 9: 1503-1510.

- [89] Sanz, J. M., and F. Di Virgilio (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 164: 4893-4898.
- [90] Bleumink-Pluym, N. M., L. B. van Alphen, L. I. Bouwman, M. M. Wosten, and J. P. van Putten (2013) Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS pathogens*. 9: e1003393.
- [91] Kaisho, T., and S. Akira (2006) Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 117: 979-987; quiz 988.
- [92] Ismail, M. G., S. R. Vavricka, G. A. Kullak-Ublick, M. Fried, D. Mengin-Lecreulx, and S. E. Girardin (2006) hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 84: 1313-1319.
- [93] Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y. G. Kim, Y. Hu, D. E. Smith, G. J. Boons, and G. Nunez (2009) Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 182: 4321-4327.
- [94] Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott, and M. Adib-Conquy (2005) Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *European journal of immunology*. 35: 2459-2470.
- [95] Netea, M. G., C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer, and C. A. Dinarello (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*. 113: 2324-2335.
- [96] Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau, and F. Di Virgilio (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of experimental medicine*. 185: 579-582.
- [97] Conforti-Andreoni, C., O. Beretta, G. Licandro, H. L. Qian, M. Urbano, F. Vitulli, P. Ricciardi-Castagnoli, and A. Mortellaro (2010) Synergism of NOD2 and NLRP3

- activators promotes a unique transcriptional profile in murine dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*. 88: 1207-1216.
- [98] Uehara, A., and H. Takada (2008) Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *Journal of dental research*. 87: 682-686.
- [99] Ku, G., T. Faust, L. L. Lauffer, D. J. Livingston, and M. W. Harding (1996) Interleukin-1 beta converting enzyme inhibition blocks progression of type II collagen-induced arthritis in mice. *Cytokine*. 8: 377-386.
- [100] Stehlik, C. (2009) Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 60: 3524-3530.
- [101] Rezaie, P., and D. Male (2002) Mesoglia & microglia-a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *Journal of the history of the neurosciences*. 11: 325-374.
- [102] Chan, W. Y., S. Kohsaka, and P. Rezaie (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain research reviews*. 53: 344-354.
- [103] Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*. 308: 1314-1318.
- [104] Nakamura, Y. (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 25: 945-953.
- [105] Block, M. L., L. Zecca, and J. S. Hong (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*. 8: 57-69.
- [106] Skaper, S. D., L. Facci, and P. Giusti (2014) Neuroinflammation, Microglia and Mast Cells in the Pathophysiology of Neurocognitive Disorders: A Review. *CNS & neurological disorders drug targets*.
- [107] Gonzalez-Scarano, F., and G. Baltuch (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*. 22: 219-240.
- [108] Block, M. L., and J. S. Hong (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society transactions*. 35: 1127-1132.
- [109] Hanisch, U. K., and H. Kettenmann (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*. 10: 1387-1394.

- [110] Olson, J. K., and S. D. Miller (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 173: 3916-3924.
- [111] Trinchieri, G., and A. Sher (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology*. 7: 179-190.
- [112] Bsibsi, M., R. Ravid, D. Gveric, and J. M. van Noort (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 61: 1013-1021.
- [113] Lee, S. J., and S. Lee (2002) Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. 1: 181-191.
- [114] Dringen, R., R. Gebhardt, and B. Hamprecht (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain research*. 623: 208-214.
- [115] Song, H., C. F. Stevens, and F. H. Gage (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417: 39-44.
- [116] Wilson, J. X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 75: 1149-1163.
- [117] Sharma, V., M. Mishra, S. Ghosh, R. Tewari, A. Basu, P. Seth, and E. Sen (2007) Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain research bulletin*. 73: 55-63.
- [118] Dong, Y., and E. N. Benveniste (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*. 36: 180-190.
- [119] Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*. 28: 138-145.
- [120] Anderson, M. A., Y. Ao, and M. V. Sofroniew (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters*. 565: 23-29.
- [121] Tran, P. B., and R. J. Miller (2003) Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nature reviews. Neuroscience*. 4: 444-455.
- [122] Imitola, J., M. Comabella, A. K. Chandraker, F. Dangond, M. H. Sayegh, E. Y. Snyder, and S. J. Khoury (2004) Neural stem/progenitor cells express costimulatory

- molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli. *The American journal of pathology*. 164: 1615-1625.
- [123] Pluchino, S., L. Zanotti, M. Deleidi, and G. Martino (2005) Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain research. Brain research reviews*. 48: 211-219.
- [124] Farina, C., M. Krumbholz, T. Giese, G. Hartmann, F. Aloisi, and E. Meinl (2005) Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 159: 12-19.
- [125] Esen, N., F. Y. Tanga, J. A. DeLeo, and T. Kielian (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *Journal of neurochemistry*. 88: 746-758.
- [126] Carpentier, P. A., W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, W. J. Karpus, and S. D. Miller (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*. 49: 360-374.
- [127] http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Meningokokken.html
- [128] <http://www.cdc.gov/meningitis/viral.html>
- [129] Yoder, J. S., B. A. Eddy, G. S. Visvesvara, L. Capewell, and M. J. Beach (2010) The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and infection*. 138: 968-975.
- [130] Woehrl, B., M. Klein, D. Grandgirard, U. Koedel, and S. Leib (2011) Bacterial meningitis: current therapy and possible future treatment options. *Expert review of anti-infective therapy*. 9: 1053-1065.
- [131] Koedel, U., W. M. Scheld, and H. W. Pfister (2002) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *The Lancet. Infectious diseases*. 2: 721-736.
- [132] Somand, D., and W. Meurer (2009) Central nervous system infections. *Emergency medicine clinics of North America*. 27: 89-100, ix.
- [133] Brouwer, M. C., A. R. Tunkel, and D. van de Beek (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical microbiology reviews*. 23: 467-492.

- [134] Pedersen, P. H., G. J. Rucklidge, S. J. Mork, A. J. Terzis, O. Engebraaten, M. Lund-Johansen, E. O. Backlund, O. D. Laerum, and R. Bjerkvig (1994) Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion. *Journal of the National Cancer Institute*. 86: 1593-1599.
- [135] Alcolado, R., R. O. Weller, E. P. Parrish, and D. Garrod (1988) The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathology and applied neurobiology*. 14: 1-17.
- [136] Leib, S. L., and M. G. Tauber (1999) Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infectious disease clinics of North America*. 13: 527-548, v-vi.
- [137] Saez-Llorens, X., and G. H. McCracken, Jr. (2003) Bacterial meningitis in children. *Lancet*. 361: 2139-2148.
- [138] Nudelman, Y., and A. R. Tunkel (2009) Bacterial meningitis: epidemiology, pathogenesis and management update. *Drugs*. 69: 2577-2596.
- [139] Edmond, K., A. Clark, V. S. Korczak, C. Sanderson, U. K. Griffiths, and I. Rudan (2010) Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*. 10: 317-328.
- [140] van de Beek, D., J. de Gans, L. Spanjaard, M. Weisfelt, J. B. Reitsma, and M. Vermeulen (2004) Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *The New England journal of medicine*. 351: 1849-1859.
- [141] Raetz, C. R. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annual review of biochemistry*. 59: 129-170.
- [142] Zughaier, S. M., Y. L. Tzeng, S. M. Zimmer, A. Datta, R. W. Carlson, and D. S. Stephens (2004) Neisseria meningitidis lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. *Infection and immunity*. 72: 371-380.
- [143] Tikhomirov, E. (1987) Meningococcal meningitis: global situation and control measures. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. 40: 98-109.
- [144] Harrison, L. H., C. L. Trotter, and M. E. Ramsay (2009) Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 27 Suppl 2: B51-63.
- [145] Ruttimann, R. W., A. Gentile, M. M. Parra, X. Saez-Llorens, M. A. Safadi, and M. E. Santolaya (2014) A consensus statement: meningococcal disease among infants,

- children and adolescents in Latin America. *The Pediatric infectious disease journal*. 33: 284-290.
- [146] Yazdankhah, S. P., and D. A. Caugant (2004) *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *Journal of medical microbiology*. 53: 821-832.
- [147] Bille, E., J. R. Zahar, A. Perrin, S. Morelle, P. Kriz, K. A. Jolley, M. C. Maiden, C. Dervin, X. Nassif, and C. R. Tinsley (2005) A chromosomally integrated bacteriophage in invasive meningococci. *The Journal of experimental medicine*. 201: 1905-1913.
- [148] Mairey, E., A. Genovesio, E. Donnadieu, C. Bernard, F. Jaubert, E. Pinard, J. Seylaz, J. C. Olivo-Marin, X. Nassif, and G. Dumenil (2006) Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine*. 203: 1939-1950.
- [149] Coureuil, M., O. Join-Lambert, H. Lecuyer, S. Bourdoulous, S. Marullo, and X. Nassif (2012) Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence*. 3: 164-172.
- [150] Plant, L., J. Sundqvist, S. Zughaier, L. Lovkvist, D. S. Stephens, and A. B. Jonsson (2006) Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infection and immunity*. 74: 1360-1367.
- [151] Stephens, D. S., B. Greenwood, and P. Brandtzaeg (2007) Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 369: 2196-2210.
- [152] Voelcker, A. F.: Pathologic Report, abstracted , Middlesex Hosp. Rep. , 1894, p. 279
- [153] Waterhouse, R.: A Case of Suprarenal Apoplexy , *Lancet* 1:577-579, 1911.
- [154] Weinberg, L. D., and McGavack, T. H.: The Waterhouse-Friderichsen Syndrome, *New England J. Med.* 232:95-101 ((Jan. 25)) 1945
- [155] Beutler, B., and E. T. Rietschel (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews. Immunology*. 3: 169-176.
- [156] Tan, Y. C., A. K. Gill, and K. S. Kim (2014) Treatment strategies for central nervous system infections: an update. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 1-17.
- [157] Nakayama, H., K. Kurokawa, and B. L. Lee (2012) Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *The FEBS journal*. 279: 4247-4268.

- [158] Tong, H. H., L. E. Blue, M. A. James, and T. F. DeMaria (2000) Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infection and immunity*. 68: 921-924.
- [159] Austrian, R. (1981) Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Reviews of infectious diseases*. 3 Suppl: S1-17.
- [160] Mitchell, T. J., and P. W. Andrew (1997) Biological properties of pneumolysin. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*. 3: 19-26.
- [161] Rubins, J. B., D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, J. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, and E. N. Janoff (1996) Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 153: 1339-1346.
- [162] Tuomanen, E. (1996) Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS microbiology reviews*. 18: 289-299.
- [163] Rodriguez, A. F., S. L. Kaplan, E. P. Hawkins, and E. O. Mason, Jr. (1991) Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model. *The Journal of infectious diseases*. 164: 1207-1209.
- [164] Zwijnenburg, P. J., T. van der Poll, S. Florquin, S. J. van Deventer, J. J. Roord, and A. M. van Furth (2001) Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *The Journal of infectious diseases*. 183: 1143-1146.
- [165] Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, and E. I. Tuomanen (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. 377: 435-438.
- [166] Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *The Journal of clinical investigation*. 102: 347-360.
- [167] Simberkoff, M. S., N. H. Moldover, and J. Rahal, Jr. (1980) Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 95: 362-372.

- [168] Stahel, P. F., and S. R. Barnum (1997) Bacterial meningitis: complement gene expression in the central nervous system. *Immunopharmacology*. 38: 65-72.
- [169] Laflamme, N., H. Echchannaoui, R. Landmann, and S. Rivest (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *European journal of immunology*. 33: 1127-1138.
- [170] Klein, M., B. Obermaier, B. Angele, H. W. Pfister, H. Wagner, U. Koedel, and C. J. Kirschning (2008) Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of infectious diseases*. 198: 1028-1036.
- [171] Letiembre, M., H. Echchannaoui, F. Ferracin, S. Rivest, and R. Landmann (2005) Toll-like receptor-2 deficiency is associated with enhanced brain TNF gene expression during pneumococcal meningitis. *Journal of neuroimmunology*. 168: 21-33.
- [172] Liu X., Q. Han, J. Leng (2014) Analysis of nucleotide-binding oligomerization domain proteins in a murine model of pneumococcal meningitis. *BMC Infectious diseases*. 14: 648
- [173] Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A. C. Hocke, S. Rosseau, S. Hammerschmidt, R. R. Schumann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry*. 279: 36426-36432.
- [174] Saez-Llorens, X., and G. H. McCracken, Jr. (2007) Glycerol and bacterial meningitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 45: 1287-1289.
- [175] Steens, A., M. A. Bergsaker, I. S. Aaberge, K. Ronning, and D. F. Vestrheim (2013) Prompt effect of replacing the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine with the 13-valent vaccine on the epidemiology of invasive pneumococcal disease in Norway. *Vaccine*. 31: 6232-6238.
- [176] Wu D. B., N. Chaiyakunapruk, H. Y. Chong, P. Beutels (2015) Choosing between 7-, 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines in childhood: a review of economic evaluations (2006-2014). *Vaccine*. 33: 1633-1658.

- [177] Verthelyi, D. (2001) Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *International immunopharmacology*. 1: 983-993.
- [178] Bhatia A., H. K. Sekhon, G. Kaur (2014) Sex hormones and immune dimorphism. *World Scientific Journal*. 2014: 159150.
- [179] Priyanka, H. P., H. C. Krishnan, R. V. Singh, L. Hima, and S. Thyagarajan (2013) Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular immunology*. 56: 328-339.
- [180] Salem M. L. (2004) Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Current drug targets-Inflammation & Allergy*. 3: 97-104.
- [181] Schreiber, A. (2007) Autoimmune disease and the female patient. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 19: 153-162, v.
- [182] Merrill, S. J., and Y. Mu (2015) Thyroid autoimmunity as a window to autoimmunity: An explanation for sex differences in the prevalence of thyroid autoimmunity. *Journal of theoretical biology*.
- [183] Jiang, W., and G. Gilkeson (2014) Sex Differences in monocytes and TLR4 associated immune responses; implications for systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of immunotherapy applications*. 1: 1.
- [184] Saleh, M., J. C. Mathison, M. K. Wolinski, S. J. Bensinger, P. Fitzgerald, N. Droin, R. J. Ulevitch, D. R. Green, and D. W. Nicholson (2006) Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature*. 440: 1064-1068.
- [185] Yeretssian, G., K. Doiron, W. Shao, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, D. W. Nicholson, and M. Saleh (2009) Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 9016-9020.
- [186] Klein, S. L. (2000) The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 24: 627-638.

- [187] Angele, M. K., S. Pratschke, W. J. Hubbard, and I. H. Chaudry (2014) Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 5: 12-19.
- [188] McGowan, J. E., Jr., M. W. Barnes, and M. Finland (1975) Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972), with special reference to hospital-acquired cases. *The Journal of infectious diseases*. 132: 316-335.
- [189] Rettew, J. A., Y. M. Huet-Hudson, and I. Marriott (2008) Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of reproduction*. 78: 432-437.
- [190] Furman, D., B. P. Hejblum, N. Simon, V. Jojic, C. L. Dekker, R. Thiebaut, R. J. Tibshirani, and M. M. Davis (2014) Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 869-874.
- [191] McClelland, E. E., and J. M. Smith (2011) Gender specific differences in the immune response to infection. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 59: 203-213.
- [192] Benfield, T., F. Espersen, N. Frimodt-Moller, A. G. Jensen, A. R. Larsen, L. V. Pallesen, R. Skov, H. Westh, and P. Skinhoj (2007) Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult Staphylococcus aureus bacteraemia between 1981 and 2000. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 13: 257-263.
- [193] Allard, C., A. Carignan, M. Bergevin, I. Boulais, V. Tremblay, P. Robichaud, R. Duperval, and J. Pepin (2008) Secular changes in incidence and mortality associated with Staphylococcus aureus bacteraemia in Quebec, Canada, 1991-2005. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 14: 421-428.
- [194] Al-Hasan, M. N., J. W. Wilson, B. D. Lahr, J. E. Eckel-Passow, and L. M. Baddour (2008) Incidence of Pseudomonas aeruginosa bacteremia: a population-based study. *The American journal of medicine*. 121: 702-708.

- [195] Laupland, K. B., D. B. Gregson, D. L. Church, T. Ross, and J. D. Pitout (2008) Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 14: 1041-1047.
- [196] Kadioglu, A., A. M. Cuppone, C. Trappetti, T. List, A. Spreafico, G. Pozzi, P. W. Andrew, and M. R. Oggioni (2011) Sex-based differences in susceptibility to respiratory and systemic pneumococcal disease in mice. *The Journal of infectious diseases*. 204: 1971-1979.
- [197] McCarthy, K. D., and J. de Vellis (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology*. 85: 890-902.
- [198] Lehmann, S. M., K. Rosenberger, C. Kruger, P. Habel, K. Derkow, D. Kaul, A. Rybak, C. Brandt, E. Schott, F. G. Wulczyn, and S. Lehnardt (2012) Extracellularly delivered single-stranded viral RNA causes neurodegeneration dependent on TLR7. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 189: 1448-1458.
- [199] Park, J. H., Y. G. Kim, C. McDonald, T. D. Kanneganti, M. Hasegawa, M. Body-Malapel, N. Inohara, and G. Nunez (2007) RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 178: 2380-2386.
- [200] Bist, P., N. Dikshit, T. H. Koh, A. Mortellaro, T. T. Tan, and B. Sukumaran (2014) The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. *Infection and immunity*. 82: 1112-1122.
- [201] Yoo, N. J., W. S. Park, S. Y. Kim, J. C. Reed, S. G. Son, J. Y. Lee, and S. H. Lee (2002) Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 β processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 299: 652-658.
- [202] Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, L. Franchi, and G. Nunez (2007) Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 82: 220-225.

- [203] Bruey, J. M., N. Bruey-Sedano, R. Newman, S. Chandler, C. Stehlik, and J. C. Reed (2004) PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 279: 51897-51907.
- [204] Toma, C., N. Higa, Y. Koizumi, N. Nakasone, Y. Ogura, A. J. McCoy, L. Franchi, S. Uematsu, J. Sagara, S. Taniguchi, H. Tsutsui, S. Akira, J. Tschopp, G. Nunez, and T. Suzuki (2010) Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 184: 5287-5297.
- [205] Semper, R. P., R. Mejias-Luque, C. Gross, F. Anderl, A. Muller, M. Vieth, D. H. Busch, C. Prazeres da Costa, J. Ruland, O. Gross, and M. Gerhard (2014) *Helicobacter pylori*-induced IL-1beta secretion in innate immune cells is regulated by the NLRP3 inflammasome and requires the *cag* pathogenicity island. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 193: 3566-3576.
- [206] Meixenberger, K., F. Pache, J. Eitel, B. Schmeck, S. Hippenstiel, H. Slevogt, P. N'Guessan, M. Witzernath, M. G. Netea, T. Chakraborty, N. Suttorp, and B. Opitz (2010) *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 184: 922-930.
- [207] Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V. F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin (2009) Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 179: 903-913.
- [208] Hoffman, H. M., P. Scott, J. L. Mueller, A. Misaghi, S. Stevens, G. D. Yancopoulos, A. Murphy, D. M. Valenzuela, and R. Liu-Bryan (2010) Role of the leucine-rich repeat domain of cryopyrin/NALP3 in monosodium urate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis and rheumatism*. 62: 2170-2179.
- [209] Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 453: 1122-1126.

- [210] Duncan, J. A., D. T. Bergstralh, Y. Wang, S. B. Willingham, Z. Ye, A. G. Zimmermann, and J. P. Ting (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 8041-8046.
- [211] Xie, Q., W. W. Shen, J. Zhong, C. Huang, L. Zhang, and J. Li (2014) Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL1beta and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells. *International journal of molecular medicine*. 34: 341-349.
- [212] Kanneganti, T. D., M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, J. Whitfield, L. Franchi, Z. F. Taraporewala, D. Miller, J. T. Patton, N. Inohara, and G. Nunez (2006) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry*. 281: 36560-36568.
- [213] Claes, A. K., N. Steck, D. Schultz, U. Zahring, S. Lipinski, P. Rosenstiel, K. Geddes, D. J. Philpott, H. Heine, and G. A. Grassl (2014) Salmonella enterica serovar Typhimurium DeltamsbB Triggers Exacerbated Inflammation in Nod2 Deficient Mice. *PloS one*. 9: e113645.
- [214] Franchi, L., T. D. Kanneganti, G. R. Dubyak, and G. Nunez (2007) Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *The Journal of biological chemistry*. 282: 18810-18818.
- [215] Raices, R. M., Y. Kannan, A. Sarkar, V. Bellamkonda-Athmaram, and M. D. Wewers (2008) A synergistic role for IL-1beta and TNFalpha in monocyte-derived IFNgamma inducing activity. *Cytokine*. 44: 234-241.
- [216] van Well, G. T., M. S. Sanders, S. Ouburg, V. Kumar, A. M. van Furth, and S. A. Morre (2013) Single nucleotide polymorphisms in pathogen recognition receptor genes are associated with susceptibility to meningococcal meningitis in a pediatric cohort. *PloS one*. 8: e64252.
- [217] Hanamsagar, R., V. Torres, and T. Kielian (2011) Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *Journal of neurochemistry*. 119: 736-748.

- [218] Boza-Serrano, A., J. F. Reyes, N. L. Rey, H. Leffler, L. Bousset, U. Nilsson, P. Brundin, J. Venero, M. Burguillos, and T. Deierborg (2014) The role of Galectin-3 in alpha-synuclein-induced microglial activation. *Acta neuropathologica communications*. 2: 156.
- [219] Facci, L., M. Barbierato, C. Marinelli, C. Argentini, S. D. Skaper, and P. Giusti (2014) Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1beta release. *Scientific reports*. 4: 6824.
- [220] Heo, D. K., H. M. Lim, J. H. Nam, M. G. Lee, and J. Y. Kim (2015) Regulation of phagocytosis and cytokine secretion by store-operated calcium entry in primary isolated murine microglia. *Cellular signalling*. 27: 177-186.
- [221] Su, L. F., B. A. Kidd, A. Han, J. J. Kotzin, and M. M. Davis (2013) Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity*. 38: 373-383.
- [222] Giannoni, E., L. Guignard, M. Knaup Reymond, M. Perreau, M. Roth-Kleiner, T. Calandra, and T. Roger (2011) Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infection and immunity*. 79: 2690-2698.
- [223] Munding, C., M. Keller, G. Niklaus, S. Papin, J. Tschopp, S. Werner, and H. D. Beer (2006) The estrogen-responsive B box protein: a novel enhancer of interleukin-1beta secretion. *Cell death and differentiation*. 13: 1938-1949.
- [224] Sankaran-Walters, S., M. Macal, I. Grishina, L. Nagy, L. Goulart, K. Coolidge, J. Li, A. Fenton, T. Williams, M. K. Miller, J. Flamm, T. Prindiville, M. George, and S. Dandekar (2013) Sex differences matter in the gut: effect on mucosal immune activation and inflammation. *Biology of sex differences*. 4: 10.
- [225] Ogura, Y., L. Saab, F. F. Chen, A. Benito, N. Inohara, and G. Nunez (2003) Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. *Genomics*. 81: 369-377.
- [226] Corridoni, D., K. O. Arseneau, M. G. Cifone, and F. Cominelli (2014) The dual role of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Frontiers in immunology*. 5: 317.

- [227] Jeong, Y. J., M. J. Kang, S. J. Lee, C. H. Kim, J. C. Kim, T. H. Kim, D. J. Kim, D. Kim, G. Nunez, and J. H. Park (2014) Nod2 and Rip2 contribute to innate immune responses in mouse neutrophils. *Immunology*. 143: 269-276.
- [228] Windheim, M., C. Lang, M. Pegg, L. A. Plater, and P. Cohen (2007) Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *The Biochemical journal*. 404: 179-190.
- [229] Ferrero-Miliani, L., O. H. Nielsen, P. S. Andersen, and S. E. Girardin (2007) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and experimental immunology*. 147: 227-235.
- [230] Lee, S. I., S. K. Kang, H. J. Jung, Y. H. Chun, Y. D. Kwon, and E. C. Kim (2014) Muramyl dipeptide activates human beta defensin 2 and pro-inflammatory mediators through Toll-like receptors and NLRP3 inflammasomes in human dental pulp cells. *Clinical oral investigations*.
- [231] Baron, L., A. Gombault, M. Fanny, B. Villeret, F. Savigny, N. Guillou, C. Panek, M. Le Bert, V. Lagente, F. Rassendren, N. Riteau, and I. Couillin (2015) The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell death & disease*. 6: e1629.
- [232] Netea, M. G., A. Simon, F. van de Veerdonk, B. J. Kullberg, J. W. Van der Meer, and L. A. Joosten (2010) IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS pathogens*. 6: e1000661.
- [233] Wittmann, M., S. R. Kingsbury, and M. F. McDermott (2011) Is caspase 1 central to activation of interleukin-1? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 78: 327-330.
- [234] Mariathasan, S. (2007) ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 9: 664-671.
- [235] Blau, E. B. (1985) Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *The Journal of pediatrics*. 107: 689-693.
- [236] Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins, and J. Tschopp (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 20: 319-325.

- [237] Dode, C., N. Le Du, L. Cuisset, F. Letourneur, J. M. Berthelot, G. Vaudour, A. Meyrier, R. A. Watts, D. G. Scott, A. Nicholls, B. Granel, C. Frances, F. Garcier, P. Edery, S. Boulinguez, J. P. Domergues, M. Delpech, and G. Grateau (2002) New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *American journal of human genetics*. 70: 1498-1506.
- [238] Dinarello, C. A. (2014) An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 20 Suppl 1: S43-58.
- [239] Randle, J. C., M. W. Harding, G. Ku, M. Schonharting, and R. Kurrle (2001) ICE/Caspase-1 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs. *Expert opinion on investigational drugs*. 10: 1207-1209.
- [240] Ravizza, T., S. M. Lucas, S. Balosso, L. Bernardino, G. Ku, F. Noe, J. Malva, J. C. Randle, S. Allan, and A. Vezzani (2006) Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia*. 47: 1160-1168.
- [241] Noe, F. M., N. Polascheck, F. Frigerio, M. Bankstahl, T. Ravizza, S. Marchini, L. Beltrame, C. R. Bandero, W. Loscher, and A. Vezzani (2013) Pharmacological blockade of IL-1beta/IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*. 59: 183-193.
- [242] Monroe, K. M., Z. Yang, J. R. Johnson, X. Geng, G. Doitsh, N. J. Krogan, and W. C. Greene (2014) IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science (New York, N.Y.)*. 343: 428-432.

Internetlinks

www.heilberufe-ausbildung.de

<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt07-id-characterization-nm.html>

http://www.rki.de/DE/Content/-Infekt/EpidBull/Archiv/2014/36/Art_02.html 2014).

Publikationsliste

1. Eckert, J. K., Y. J. Kim, J. I. Kim, K. Gurtler, D. Y. Oh, S. Sur, **L. Lundvall**, L. Hamann, A. van der Ploeg, P. Pickkers, E. Giamarellos-Bourboulis, A. V. Kubarenko, A. N. Weber, M. Kabesch, O. Kumpf, H. J. An, J. O. Lee, and R. R. Schumann (2013) The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*. 39: 647-660.
2. Pflugmacher, S., K. Jung, **L. Lundvall**, S. Neumann, and A. Peuthert (2006) Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental toxicology and chemistry/SETAC*. 25: 2381-2387.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer an der Charité, Prof. Dr. Ralf R. Schumann, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft. Außerdem danke ich ihm für das freundliche Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe, das mir viel Druck genommen hat.

Meinem offiziellen Doktorvater an der HU, Herrn Prof. Dr. Erwin Schneider, möchte ich für die Begutachtung meiner Dissertation danken sowie seiner Geduld und Zuversicht. Dank auch an Prof. Bastian Opitz für die Übernahme des 3. Gutachtens.

Natürlich bedanke ich mich bei allen Freunden und Weggefährten der AG Schumann, von denen ich vieles gelernt habe: Jana und Djin-Ye, Gunthard, Janine, Fränzi, Diana, Solvy, Lutz, Sarah, Lena und Nickel und aus der AG Slevogt: Frauke und Annina und Luis.

Aber Spaß hatten wir auch!

Auch durch das Graduiertenkolleg 1258 „Neuroinflammation“ (MDC/Charité) habe ich viele Menschen getroffen, die mir nicht nur bei meiner Dissertation geholfen sondern auch Teile meines Doktorandenlebens erleichtert haben: Prof. Kettenmann, Stefanie Korthals, Olaf Hoffmann, Dorette Freyer, Katja, Jochen, Karen und Sabrina. Der AG Bereswill danke ich für die Unterstützung im FEM: Stefan, André und Gernot.

Meine Freunde Julia M., Mel, Nina E. und Thilde, die mich in diesen Jahren begleitet und mir zugehört haben.

Ich danke allen, die mir während der aufregenden und langjährigen Promotionsphase die Daumen gedrückt haben: Meinen Eltern, Zek, Geschwistern, Familie Ademi und allen Verwandten.

In dieser Zeit sind meine drei großartigen Kinder zur Welt gekommen, die mein Leben völlig auf den Kopf gestellt und dabei zu 100% bereichert haben:

Lunik, Milon und Rubin! Euch widme ich diese Arbeit!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Linn Lundvall, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich habe bei wörtlich übernommenen Aussagen und unverändert oder verändert übernommenen Grafiken und Tabellen ausnahmslos die Quelle angegeben.

Berlin, den